

Untersuchungen zur Isoform  $\alpha_2\beta_1$  der NO-sensitiven Guanylat-Cyclase  
hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und möglicher  
Interaktionspartner

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Julia Hochheiser  
aus Wilhelmshaven

1. Referent

2. Referent

Eingereicht am:

Disputation am:

Druckjahr 2018

Professor Dr. Sönke Behrends

Professor Dr. Ingo Rustenbeck

28.02.2018

10.08.2018

## Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

**Hochheiser, J.**; Haase, T.; Busker, M.; Sömmer, A.; Kreienkamp, H.-J.; Behrends, S. (2016): Heterodimerization with the  $\beta 1$  subunit directs the  $\alpha 2$  subunit of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase to calcium-insensitive cell-cell contacts in HEK293 cells: Interaction with Lin7a. In: *Biochemical Pharmacology* 122, S. 23–32.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Der NO/cGMP-Signalweg.....	5
1.1.1	Bildung von NO.....	6
1.1.2	Die NOsGC.....	7
1.1.3	Zielstrukturen des sekundären Botenstoffs cGMP.....	9
1.2	<b>Der NO/cGMP-Signalweg als Angriffspunkt für Arzneistoffe.....</b>	<b>11</b>
1.3	<b>Die NOsGC im neuronalen Kontext .....</b>	<b>12</b>
1.3.1	Funktion der NOsGC bei der neuronalen Signaltransduktion .....	12
1.3.2	Membranäre Lokalisation der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$ .....	15
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1	<b>Material .....</b>	<b>18</b>
3.1.1	Hilfsmittel und Geräte .....	18
3.1.2	Chemikalien und Substanzen.....	20
3.1.3	Reagenziensysteme .....	21
3.1.4	Puffer und Lösungen.....	22
3.1.5	Zellen .....	23
3.1.6	Verwendete Medien.....	23
3.1.7	Tierhaltung und Organentnahme .....	23
3.1.8	Antikörper.....	24
3.1.9	DNA-Konstrukte.....	25
3.1.10	Oligonucleotide.....	26
3.1.11	siRNA .....	26
3.1.12	Programme.....	27
3.2	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>27</b>
3.2.1	Herstellung kompetenter E. coli .....	27
3.2.2	Transformation.....	27
3.2.3	Plasmidisolation aus E. coli .....	28
3.2.4	Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese .....	28
3.2.5	Klonierung der verwendeten Konstrukte .....	29
3.2.6	Mutagenese .....	35
3.2.7	Analyse der Plasmid-DNA .....	37
3.3	<b>Proteinbiochemische Methoden und Kultivierung eukaryotischer Zellen.....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Kultivierung von HEK293-Zellen .....	37
3.3.2	Proteinexpression in HEK293-Zellen.....	38
3.3.3	Knockdown endogener Proteine in HEK293-Zellen mithilfe von siRNA.....	38



3.3.4	Cytosol- und Membrangewinnung aus HEK293-Zellen .....	39
3.3.5	Gewinnung von Cytosol und grobem Synaptosom aus Maushirn .....	40
3.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	41
3.3.7	Immunopräzipitation .....	41
3.3.8	SDS-PAGE und Western Blot .....	42
<b>3.4</b>	<b>Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie .....</b>	<b>43</b>
3.4.1	Detektion der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation fluoreszierender Proteine .....	45
<b>3.5</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Beeinflussung der subzellulären Lokalisation der NOsGC-Isoform <math>\alpha_2\beta_1</math> durch Phosphorylierung .....</b>	<b>47</b>
4.1.1	Phosphorylierung des Tyrosins 192 in der $\beta_1$ -Untereinheit .....	47
4.1.2	Phosphorylierung am Carboxyterminus der $\alpha_2$ -Untereinheit .....	49
<b>4.2</b>	<b>Interaktion der NOsGC-Isoform <math>\alpha_2\beta_1</math> mit dem Adapterprotein Lin7a .....</b>	<b>51</b>
4.2.1	Immunopräzipitation von NOsGC-Fusionskonstrukten mit GFP-Lin7a, GFP-Scribble und GFP-PSD-95 .....	52
4.2.2	Lokalisation von Lin7a an Zell-Zell-Kontakten .....	54
4.2.3	Dominant negativer Effekt von Lin7a $\Delta$ PDZ und Lin7a $\Delta$ L27 auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ .....	56
4.2.4	Immunopräzipitation von NOsGC-Fusionskonstrukten mit fluoreszenzmarkierten Lin7a-Konstrukten .....	59
4.2.5	Immunopräzipitation von endogenem Lin7a und den endogenen NOsGC-Untereinheiten $\alpha_1$ , $\alpha_2$ und $\beta_1$ mit Antikörpern gegen diese NOsGC-Untereinheiten .....	61
4.2.6	Immunopräzipitation der endogenen Gerüstproteine PSD-95 und SAP97 mit Antikörpern gegen die NOsGC-Untereinheit $\alpha_2$ und das Adapterprotein Lin7a .....	63
4.2.7	Knockdown von Lin7a in HEK293-Zellen .....	64
4.2.8	Knockdown von Scribble in HEK293-Zellen .....	66
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung des an der Lokalisation von <math>\alpha_2\beta_1</math> beteiligten Zell-Adhäsions-Systems .....</b>	<b>68</b>
4.3.1	Subzelluläre Lokalisation von $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ bei Kotransfektion mit Claudin-1 .....	69
4.3.2	Unabhängigkeit der subzellulären Lokalisation von Lin7a und $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ von extrazellulärem Calcium .....	70
4.3.1	Subzelluläre Lokalisation von $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ bei Kotransfektion mit Nectin-1 .....	71
4.3.2	Interaktion mit dem Gerüstprotein MPP3 .....	75
<b>4.4</b>	<b>Komplex zwischen Nectin-1, Lin7a und MPP3 .....</b>	<b>79</b>
4.4.1	Dirigieren von MPP3 mit intaktem Carboxyterminus durch Nectin-1 an die Membran ..	79
4.4.2	Immunopräzipitation von Nectin-1 mit YFP-MPP3 .....	84
4.4.3	Beeinflussung der Lokalisation von Lin7a und $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ durch MPP3 und Nectin-1 .....	87

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>Beeinflussung der Lokalisation der NOsGC durch Phosphorylierung .....</b>	<b>90</b>
5.1.1	Phosphorylierung durch die Src-Kinase FYN .....	90
5.1.2	Phosphorylierung der $\alpha_2$ -Untereinheit .....	92
<b>5.2</b>	<b>Lin7a als direkter Interaktionspartner der NOsGC .....</b>	<b>95</b>
<b>5.3</b>	<b>Andere direkte Interaktionspartner der NOsGC-Isoform <math>\alpha_2\beta_1</math> .....</b>	<b>103</b>
5.3.1	Scribble .....	103
5.3.2	PSD-95.....	103
<b>5.4</b>	<b>Indirekte Interaktionspartner der NOsGC-Isoform <math>\alpha_2\beta_1</math> .....</b>	<b>106</b>
5.4.1	Nectin-1 .....	106
5.4.2	MPP3 .....	107
<b>5.5</b>	<b>Komplex zwischen MPP3, Lin7a und Nectin-1.....</b>	<b>109</b>
5.5.1	Interaktion zwischen MPP3 und Lin7a.....	109
5.5.2	Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1 .....	109
5.5.3	Oligomerisierung des MAGUKs MPP3 .....	112
<b>5.6</b>	<b>Komplex aus Nectin-1, MPP3, Lin7a und der NOsGC-Isoform <math>\alpha_2\beta_1</math> .....</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>145</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>147</b>

# 1 Einleitung

„Entlastung für Herz und Lunge - vom Nitroglyzerin zu innovativen Therapien“ - mit diesem Projekt gewann das Forscherteam um Johannes-Peter Stasch im Dezember 2015 den Deutschen Zukunftspreis (Bundespräsidialamt 02.12.2015). Der Bundespräsident zeichnet mit diesem Preis innovative Projekte aus, die wissenschaftliche Exzellenz mit wirtschaftlichem Potential verbinden. Sowohl diese Ehrung als auch die ihr vorausgehende Zulassung des Wirkstoffs Riociguat zeigen, wie viel Potential in der Erforschung des NO/cGMP-Signalwegs steckt.

## 1.1 Der NO/cGMP-Signalweg

Seit der Entdeckung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch Sutherland und Rall (Sutherland und Rall 1958) wurde vermutet, dass auch andere 3', 5' zyklische Nucleotide existieren, die für die Regulierung zellphysiologischer Prozesse eine wichtige Rolle spielen könnten. Fünf Jahre später gelang es, 3',5'-zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) aus Rattenurin zu extrahieren (Ashman et al. 1963). Damit wurde gezeigt, dass Guanylyl-Cyclasen, also Enzyme, die die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in cGMP katalysieren, in Ratten vorkommen. 1977 stellte die Arbeitsgruppe um Ferid Murad fest, dass es unter Behandlung mit Stickstoffmonoxid (NO) oder NO-Donatoren in verschiedensten Geweben zu einem Anstieg der cGMP-Spiegel kommt (Arnold et al. 1977). Dabei vermuteten die Autoren, dass eine hohe Guanylyl-Cyclase Aktivität zum Beispiel in der Lunge oder der Darmschleimhaut durch eingeatmete oder über die Nahrung zugeführte Nitroverbindungen zustande kommen. Eine endogene Bildung von NO als Signalmolekül vermutete man damals noch nicht.

Parallel zu den Bemühungen, mehr über das Vorkommen von cGMP herauszufinden, entdeckten Robert F. Furchgott und seine Arbeitsgruppe, dass präparierte Aortenabschnitte auf Acetylcholin mit Kontraktion reagieren, wenn das Endothel durch die Präparation entfernt wurde, es aber zu einer Vasodilatation kommt, wenn die Endothelschicht intakt ist (Furchgott und Zawadzki 1980). Auf Grundlage des im Folgenden beschriebenen „Sandwich-Versuchs“ konnten sie den Vermittler der Vasodilatation weiter charakterisieren: Wird ein Aortenabschnitt mit intakter Endothelschicht auf einem zweiten Aortenabschnitt fixiert, dem das Endothel bei der Präparation entfernt wurde, führt Acetylcholin zu einer Vasodilatation beider Aortenabschnitte. Durch den Stimulus Acetylcholin wird also ein Vermittler aus dem Endothel des einen Aortenabschnitts freigesetzt, der in der Lage ist, zu dem endothelfreien Aor-

tenabschnitt zu diffundieren. Die Gruppe beschrieb diese diffusionsfähige Substanz als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF, Cherry et al. 1982).

Erst einige Jahre später gelang es, den EDRF zu identifizieren: Bei der diffusionsfähigen Substanz handelt es sich um NO (Furchgott und Vanhoutte 1989; Palmer et al. 1987; Ignarro et al. 1987). Für die Aufklärung des NO/cGMP-Signalwegs wurde 1998 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin an Robert F. Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro verliehen.

### 1.1.1 Bildung von NO

Anders als von Arnold et al. 1977 vermutet, ist NO kein ausschließlich exogener Faktor, sondern wird endogen von NO-Synthasen (NOS) gebildet. Sie katalysieren die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin (Palmer et al. 1988). Man unterscheidet drei Isoformen der NOS (Andrew 1999). Davon sind zwei NOS für den NO/cGMP-Signalweg relevant: die neuronale und die endotheliale NO-Synthase (nNOS und eNOS). Eine dritte Form, die induzierbare NOS, liegt nicht konstitutiv vor und ist Teil der Immunabwehr (Hibbs et al. 1987).

Die nNOS wurde von den drei Isoformen zuerst angereinigt und kloniert (Bredt und Snyder 1990). Sie wird wie die endotheliale Form durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit einer daraus resultierenden Bindung eines Komplexes aus Calmodulin und  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert (Andrew 1999). Die nNOS wird sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem exprimiert und interagiert über eine aminoterminal PDZ-Domäne mit dem Gerüstprotein PSD-95 (Brenman et al. 1996). Diese Interaktion führt zu einer Lokalisation der NOS an der synaptischen Membran. Es bildet sich ein Komplex aus der nNOS, PSD-95 und der NR2B-Untereinheit des glutamatsensitiven NMDA-Rezeptors. Kommt es durch den NMDA-Rezeptor vermittelt durch Glutamat zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, ist die nNOS durch die PDZ-vermittelte Protein-Protein-Interaktion mit PSD-95 direkt in räumlicher Nähe, um das glutamaterge Signal in NO-Produktion zu übersetzen und so eine Brücke zum NO/cGMP-Signalweg zu schlagen (Christopherson et al. 1999).

Die ebenfalls konstitutive eNOS wurde im Endothel, in Kardiomyozyten, in Mesangiumzellen der Niere und in Thrombozyten nachgewiesen. Über ko-translationale Myristoylierung und post-translationale Palmitoylierung ist die eNOS in Endothelzellen an der Plasmamembran, genauer in kleinen Einbuchtungen, den Caveolen, lokalisiert (Shaul et al. 1996). Die eNOS wird durch Scherstress oder mechanische Dehnung, aber auch durch Acetylcholin, Bradykinin oder Histamin aktiviert. Über die Aktivität der eNOS werden Gefäßtonus und Thrombozytenaggregation beeinflusst.

### 1.1.2 Die NOsGC

Die NOsGC ist der physiologische Rezeptor für NO und damit das Schlüsselenzym der Signaltransduktion von NO zu dem sekundären Botenstoff cGMP. Dabei katalysiert das Enzym die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) unter Abspaltung eines Pyrophosphats zu cGMP.

Die NOsGC wurde zuerst aus boviner Lunge angereinigt (Gerzer et al. 1981). Nach der Aufreinigung und Auftrennung durch Gelelektrophorese fanden Gerzer und Kollegen in denaturierend behandelten Proben die Bande eines 72 kDa großen Proteins. Unter nativen Bedingungen zeigte das Gel eine Bande, die mit der Größe von 150 kDa korrespondierte. Daraus schlossen die Wissenschaftler, dass es sich bei der NOsGC um ein dimeres Protein aus zwei gleichen Untereinheiten handelt. Inzwischen ist bekannt, dass die katalytisch aktive NOsGC ein heterodimeres Protein ist, das aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Untereinheit besteht. In dem oben beschriebenen Versuch wurden die ähnlich großen Untereinheiten  $\alpha_1$  und  $\beta_1$ , die beide stark in der Lunge exprimiert werden, nicht voneinander getrennt. Die Klonierung der Untereinheiten  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  gelang zunächst aus der Lunge von Ratten und Rindern (Nakane et al. 1988; Koesling et al. 1990; Koesling et al. 1988; Nakane et al. 1990). Harteneck klonierte aus einer cDNA-Bank des zentralen Nervensystems eine weitere Untereinheit, die nicht mit  $\alpha_1$ , wohl aber mit  $\beta_1$  ein katalytisch aktives Enzym bildet: die  $\alpha_2$ -Untereinheit (Harteneck et al. 1991). Russwurm und Kollegen gelang die Kopräzipitation der  $\alpha_2$ -Untereinheit mit der  $\beta_1$ -Untereinheit aus humaner Plazenta und damit der Nachweis für die Expression der neu entdeckten Untereinheit (Russwurm et al. 1998). Folglich existieren zwei heterodimere Isoformen der NOsGC:  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$ .

Die Untereinheiten sind homolog aufgebaut und bestehen aus vier Domänen: einer Häm-bindenden (H-NOX) Domäne (Karow et al. 2005), einer PAS-Domäne, einer coiled-coiled Domäne und der carboxy-terminalen katalytischen Domäne (Cary et al. 2006). Dabei ist die coiled-coiled Domäne hauptsächlich für die Dimerisierung verantwortlich (Adachi et al. 2009; Rothkegel et al. 2007). Die katalytische Domäne ist der katalytischen Domäne der Adenylyl-Cyclase sehr ähnlich. Ein Austausch von drei Aminosäuren verwandelt die NOsGC in eine NOsAC (Sunahara et al. 1998). In der H-NOX-Domäne der  $\beta_1$ -Untereinheit befindet sich eine prosthetische Häm-Gruppe. NO stimuliert die NOsGC durch Bindung an das Eisen(II)-Ion der Häm-Gruppe, wodurch die Bindung zwischen Eisen(II) und Histidin 105 der  $\beta_1$ -Untereinheit gebrochen wird (Wedel et al. 1994). Wie genau das Signal von der H-NOX-Domäne der  $\beta_1$ -Untereinheit zu der katalytischen Domäne kommuniziert wird, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben der Hypothese, dass das Signal linear von der H-NOX-Domäne über PAS-

Domäne und coiled-coiled Domäne zur katalytischen Domäne kommuniziert wird (Padayatti et al. 2004), sprechen neuere Daten dafür, dass es neben dieser Übermittlung auch eine direkte Interaktion zwischen HNOX- und katalytischer Domäne gibt (Winger und Marletta 2005; Busker et al. 2014).

In Untersuchungen zur Enzymkinetik zeigten die Isoformen  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$  keine signifikanten Unterschiede in Aktivität oder Sensitivität gegenüber NO (Russwurm et al. 1998). Auch BAY41-2272, das dem 2014 zugelassenen Riociguat ähnelt, erhöht die NO-Sensitivität beider Isoformen gleichermaßen (Koglin et al. 2002). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass der NOsGC-Aktivator Cinaciguat die Isoform  $\alpha_1\beta_1$  stärker aktiviert als die Isoform  $\alpha_2\beta_1$  (Haase et al. 2010a).

Auch die Expression der Isoformen weist Unterschiede auf. Die  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten kommen im Gewebe von Säugern ubiquitär vor. Im Vergleich dazu wird die  $\alpha_2$ -Untereinheit deutlich weniger exprimiert. Nur im Gehirn erreicht die Expression der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  die Spiegel von  $\alpha_1\beta_1$  (Mergia et al. 2003). Neben dem Nachweis der  $\alpha_2$ -Untereinheit in Plazenta und Gehirn wurde auf mRNA-Ebene auch ein Vorkommen in Uterus, Milz und Pancreas nachgewiesen (Budworth et al. 1999; Mergia et al. 2003).

In den glatten Muskelzellen der Gefäßwand ist die Isoform  $\alpha_1\beta_1$  für über 90% der cGMP-Produktion verantwortlich. Interessanterweise zeigen *Knock-out*-Mäuse, die die  $\alpha_1$ -Untereinheit nicht exprimieren, zwar eine verminderte vaskuläre Relaxation, aber nicht zwangsläufig einen erhöhten Blutdruck (Buys et al. 2012; Mergia et al. 2006). Bei Mäusen, denen durch einen  $\beta_1$ -*Knock-out* beide Isoformen der NOsGC fehlen, kommt es neben lebensbedrohlichen Motilitätsstörungen im Magen-Darm-Trakt auch zu Bluthochdruck. Das lässt für die  $\alpha_1$ -*Knock-out*-Mäuse vermuten, dass der geringe Anteil der cGMP-Produktion über die  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform ausreicht, dem Bluthochdruck entgegenzuwirken (Friebe et al. 2007). Aktuell wird diskutiert, ob spezifisch die Isoform  $\alpha_1\beta_1$ , neben ihrer Wirkung auf den NO/cGMP-Signalweg, im zentralen Nervensystem einen stimulierenden Effekt auf den Sympathikus hat (Broekmans et al. 2016). Ein Wegfall dieser Stimulation des Sympathikus bei  $\alpha_1$ -*Knock-out*-Mäusen könnte erklären, warum die stark reduzierte cGMP-Produktion im vaskulären System nicht zwangsläufig zu Bluthochdruck führt.

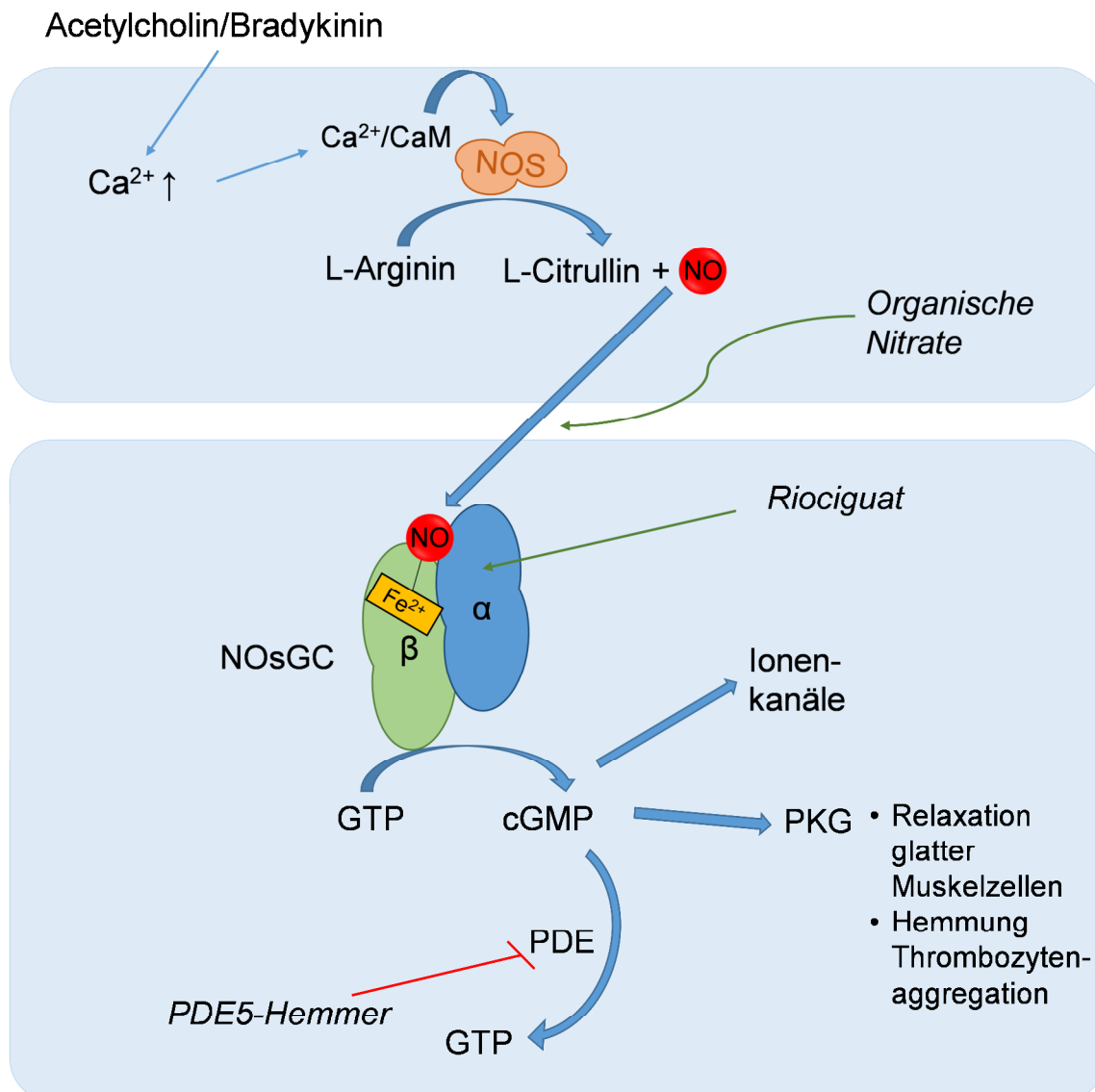
### 1.1.3 Zielstrukturen des sekundären Botenstoffs cGMP

Die Proteinkinase G (PKG) ist eine Serin/Threonin-Kinase. Wird sie von cGMP aktiviert, überträgt die PKG Pyrophosphat aus Adenosintriphosphat (ATP) auf Serin- oder Threoninreste ihrer Zielstruktur. Man unterscheidet zwischen PKGI, von der es zwei Splicing-Varianten gibt ( $\alpha$  und  $\beta$ ), und PKGII. PKGI ist die für das kardiovaskuläre System und die Thrombozyten bedeutende Proteinkinase (Lucas et al. 2000). Durch cGMP aktivierte PKGI phosphoryliert den Rezeptor für Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) sowie ein  $IP_3$ -Rezeptor assoziiertes Protein (Raeymaekers et al. 1990). Dadurch wird eine  $IP_3$ -vermittelte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum verhindert. Es kommt zum Abfall der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und so zur Vasodilatation. Eine Reihe weiterer Mechanismen trägt ebenfalls zur NO-cGMP-PKGI-induzierten Vasorelaxation bei (Alioua et al. 1998; Surks et al. 1999).

cGMP aber auch cAMP aktivieren durch zyklische Nucleotide gesteuerte Ionenkanäle (*cyclic nucleotide-gated ion channels*, CGN). Diese Kanäle sind unselektiv für Kationen permeabel und haben bei der Signaltransduktion in visuellem und olfaktorischem System eine große Bedeutung (Biel et al. 1999). Tatsächlich wurden CGN zuerst in der Retina des Frosches *Rana temporaria* entdeckt (Fesenko et al. 1985).

Phosphodiesterasen (PDE) sind eine Gruppe von Enzymen, die die 3',5' zyklisierten Nucleotide cGMP und cAMP zu den entsprechenden 5'-Monophosphaten GMP und AMP hydrolysieren. Durch ihren Einfluss auf die Konzentration der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP spielen PDEs zum Beispiel eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System, bei der adrenergen Steroidogenese, bei der Erektion des männlichen Glieds und bei der Phototransduktion (Juilfs et al. 1999). Es werden elf Isoenzyme unterschieden, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und für cAMP und cGMP unterschiedliche Affinitäten zeigen. Während die PDE-Familien 1, 2, 3, 10 und 11 sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren, spalten die Familien 4, 7 und 8 bevorzugt cAMP. Die Familien 5, 6 und 9 hydrolysieren spezifisch cGMP (Bender und Beavo 2006). Teilweise weisen die PDEs neben der Bindungsstelle im katalytischen Zentrum auch allosterische Bindungsstellen für die cyclischen Nukleotide auf. Über diese allosterische Bindung kann die cGMP-Konzentration Einfluss auf die Aktivität der PDE nehmen und den eigenen Abbau verstärken (Omori und Kotera 2007).

In Abbildung 1 ist der NO/cGMP-Signalweg abgebildet. Darin sind auch die Angriffspunkte einiger Arzneistoffgruppen eingetragen, die auf den Signalweg einwirken



**Abbildung 1: Der NO/cGMP-Signalweg, erweitert nach Derbyshire und Marletta (2012)**

Der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin (CaM) Komplex bindet zum Beispiel durch die Reize Acetylcholin oder Bradykinin an die NO-Synthase (NOS). NOS katalysiert die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO. NO bindet an das eisenhaltige Häm in der  $\beta_1$ -Untereinheit der NO-sensitiven Guanylylcyclase (NOsGC). Diese Verbindung führt zu vermehrtem Umsatz von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP bindet an die Proteinkinase G (PKG) und aktiviert diese so, bindet an cGMP-abhängige Ionenkanäle, was deren Offenwahrscheinlichkeit beeinflusst oder an cGMP-abhängige Phosphodiesterasen (PDE). Es sind mehrere Arzneistoffgruppen abgebildet, die positiv auf den NO/cGMP-Signalweg einwirken: Organische Nitrate setzen NO frei, welches die NOsGC aktiviert. Sie werden bei Angina pectoris eingesetzt. Riociguat ist der erste NOsGC-Stimulator, der mit den Indikationen chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie und pulmonale arterielle Hypertonie seit 2014 in der EU zugelassen ist. PDE5-Hemmer verzögern den Abbau von cGMP und verlängern dadurch die Wirkung des Botenstoffs. Ein Beispiel für diese Substanzklasse ist Sildenafil, welches bei erektiler Dysfunktion und pulmonaler arterieller Hypertonie eingesetzt wird.



## 1.2 Der NO/cGMP-Signalweg als Angriffspunkt für Arzneistoffe

Schon seit 1857 behandelte der englische Arzt T. Lauder Brunton Anginaschmerzen mit Inhalation des flüchtigen Vasodilatators Amylnitrit (Follmann et al. 2013). 1879 erschien im Fachjournal *Lancet* ein Artikel, der die Anwendung von Glyceroltrinitrat bei Angina pectoris beschreibt (Murrell 1879). Auch heute noch spielen die organischen Nitrate in der Pharmakotherapie der Angina pectoris eine zentrale Rolle. Während Glyceroltrinitrat als Zerbeißkapsel oder Spray nach wie vor das wichtigste Mittel zur Therapie des akuten Angina pectoris-Anfalls ist, ist die Anwendung von Isosorbiddinitrat, Isosorbidmononitrat und Pentaerythrityltetranitrat zur Prophylaxe rückläufig (Schwabe und Paffrath 2016).

Ein weiterer pharmakologischer Angriffspunkt innerhalb des NO/cGMP-Signalwegs ist die Phosphodiesterase 5 (PDE5). PDE5-Hemmer werden bei erektiler Dysfunktion und pulmonaler Hypertonie eingesetzt (Nguyen und Amanullah 2014). Der selektive PDE5-Hemmer Sildenafil wird von der Firma Pfizer unter zwei Handelsnamen vertrieben: Als Revatio® wird er gegen pulmonale arterielle Hypertonie eingesetzt und als Viagra® als Mittel gegen erektile Dysfunktion angeboten. Bei der pulmonalen arteriellen Hypertonie sind Gefäßwiderstand und Blutdruck in der Lunge erhöht. Folgen sind unter anderem eine Rechtsherzinsuffizienz und eine stark eingeschränkte körperliche Leistungsfähigkeit (Montani et al. 2014). Der PDE5-Hemmer Sildenafil erhöht die cGMP-vermittelte Vasorelaxation und vermindert so den Gefäßwiderstand. Bei erektiler Dysfunktion verstärkt Sildenafil die Wirkung von NO, das bei sexueller Stimulation aus nitrergen Nerven freigesetzt wird. Das von der NOsGC gebildete cGMP bewirkt eine Relaxation der glatten Muskulatur des Corpus cavernosum. Es folgen ein gesteigerter Bluteinstrom und damit die Erektion (Galiè et al. 2005; Corbin und Francis 1999). Neben Sildenafil sind auch Tadalafil und Vardenafil erhältlich, die sich in der Pharmakokinetik unterscheiden (Schwabe und Paffrath 2016).

Seit 1994 sind Substanzen bekannt, die die Wirkung der NOsGC direkt verstärken. Das Benzyl-Indazol-Derivat YC-1 wurde 1994 von taiwanesischen Forschern als Substanz vorgestellt, die durch NO-unabhängige Aktivierung der NOsGC die Thrombozytenaggregation hemmt (Wu et al. 1995). Die Aktivität von isolierter NOsGC wurde durch YC-1 um das 30-40 fache gesteigert. Zusammen mit NO-Donatoren zeigte sich allerdings ein noch deutlich stärkerer synergistischer Effekt. Auf Häm-freie NOsGC hat der Stimulator YC-1 keinen Einfluss (Friebe et al. 1996; Mülsch et al. 1997; Hoenicka et al. 1999). In den darauffolgenden Jahren bemühten sich die Entwickler die Substanz dahingehend zu optimieren, dass sich die Spezifität erhöht und die Pharmakokinetik verbessert (Straub et al. 2001; Griebenow et al. 2013). Die

Substanzen BAY 41-2272 und BAY 41-8543 zeigen eine höhere Potenz und eine gesteigerte Spezifität (Evgenov et al. 2006; Hoenicka und Schmid 2008). In ersten *in vivo* Versuchen in Ratten zeigte sich jedoch für beide Substanzen eine schlechte orale Bioverfügbarkeit und bei BAY 41-2272 Interaktionen mit CYP-Enzymen, was den Einsatz als Therapeutikum erschwert. Letztendlich konnten mit BAY 63-2521 (Riociguat) auch diese Schwierigkeiten aus dem Weg geräumt werden (Mittendorf et al. 2009). Im Frühjahr 2014 wurde Riociguat in der EU zugelassen und wird seitdem von den Firmen Bayer und MSD unter dem Handelsnamen Adempas<sup>®</sup> vertrieben. Riociguat ist bei verschiedenen Formen der pulmonalen Hypertonie indiziert und damit den PDE5-Hemmern überlegen, die nur bei pulmonaler arterieller Hypertonie eingesetzt werden dürfen (MSD Sharp & Dohme GmbH 2016).

Neben den NOsGC-Stimulatoren existieren auch Häm-unabhängige NOsGC-Aktivatoren, von denen Cinaciguat (BAY 58-2667) am ausführlichsten charakterisiert wurde (Stasch et al. 2002). Cinaciguat aktiviert die NOsGC um das ca. 75-fache (Kumar et al. 2013). Durch die Zugabe von ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on), welches das Eisen im Häm oxidiert und so zur hämfreien NOsGC führt, erhöht sich die Aktivierung durch Cinaciguat auf das ca. 84-fache des Basalwertes (Kumar et al. 2013; Stasch et al. 2002; Schmidt et al. 2004b; Kumar et al. 2013). Cinaciguat zeigte in einer Phase-II-Studie gute Wirksamkeit bei akuter dekompensierter Herzinsuffizienz (Lapp et al. 2009). Es kam aber unter Behandlung auch zu schwer kontrollierbaren Blutdruckabfällen, sodass die klinische Entwicklung letztendlich eingestellt wurde (Erdmann et al. 2013). Ein anderer Aktivator, BAY 60-2770, wird momentan im Tiermodell für eine Reihe von klinischen Anwendungen getestet (Holt et al. 2016; Leiria et al. 2014).

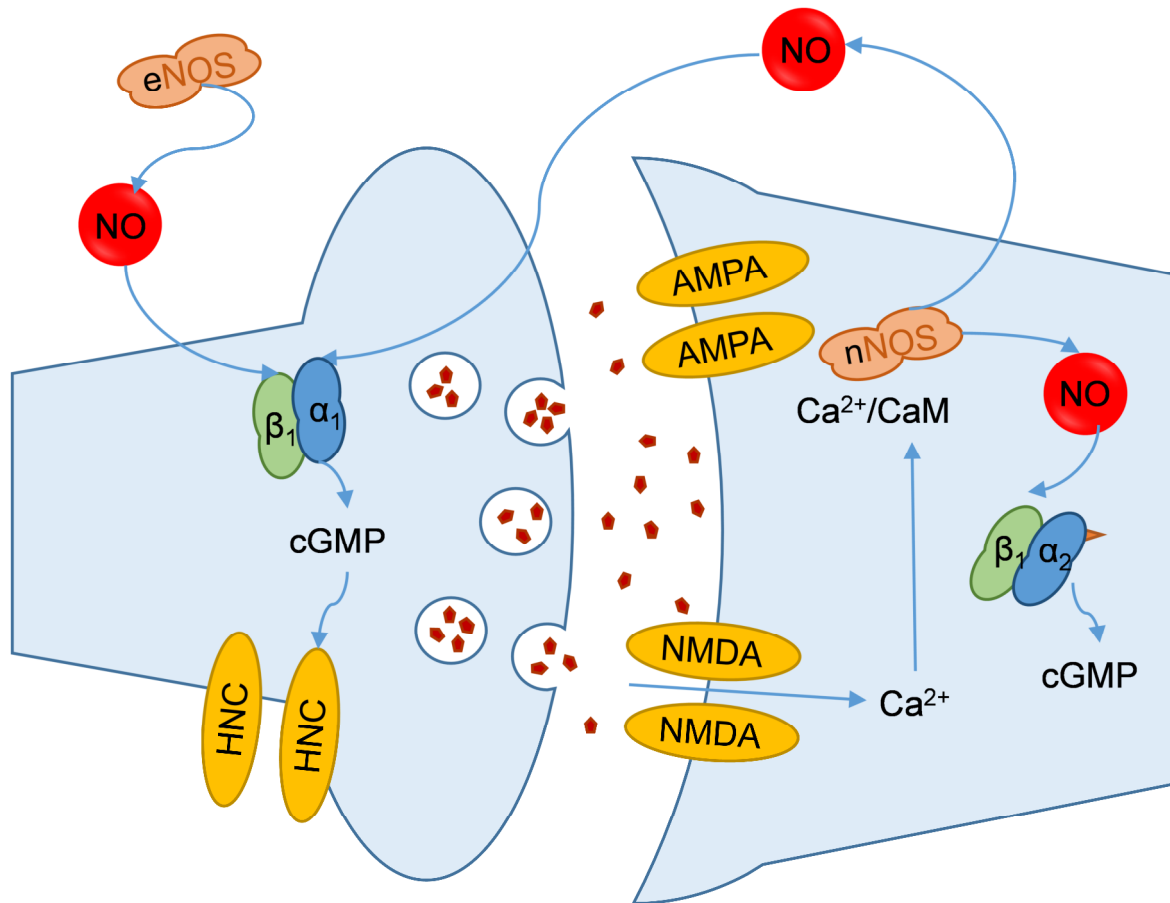
### 1.3 Die NOsGC im neuronalen Kontext

#### 1.3.1 Funktion der NOsGC bei der neuronalen Signaltransduktion

Neben der Bedeutung von NO für den Gefäßtonus und die Regulierung der Plättchenaggregation spielt das Molekül auch eine entscheidende Rolle in der neuronalen Signaltransduktion (Snyder et al. 1998). In den 70er Jahren stellte Ferrendelli fest, dass Glutamat vermittelt über  $\text{Ca}^{2+}$  zu einem Anstieg der cGMP-Spiegel im Gehirn führt (Ferrendelli et al. 1974). Nachdem der EDRF als NO identifiziert worden war, konnte Garthwaite 1988 die Abläufe in der Synapse weiter präzisieren: Durch die Stimulation des NMDA-Rezeptors durch Glutamat wird NO  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig freigesetzt. Dieses NO ist für den cGMP-Anstieg verantwortlich (Garthwaite et al. 1988).

Wenig später vermutete O'Dell, dass NO bei der Langzeitpotenzierung (LTP) als retrograder Botenstoff an der Kommunikation von der Postsynapse zurück zur Präsynapse beteiligt ist (O'Dell et al. 1991). Heute geht man davon aus, dass der NO/cGMP-Signalweg an mehreren Formen der synaptischen Plastizität beteiligt ist (Schuman und Madison 1991; Williams et al. 1993; Steinert et al. 2008; Garthwaite 2008; Nikonenko et al. 2013). Sowohl ODQ als selektiver Hemmer der NOsGC als auch der NOS-Hemmer Nitroarginin reduzieren die LTP im Hippocampus von Ratten (Boulton et al. 1995). NOS-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte LTP in der CA1-Region des Hippocampus (Son et al. 1996). Interessanterweise zeigen *Knock-out*-Mäuse, denen die  $\alpha_1$ - oder die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC fehlt, keine LTP im visuellen Cortex (Haghikia et al. 2007). Auch im Hippocampus benötigt NO sowohl die Isoform  $\alpha_1\beta_1$  als auch die Isoform  $\alpha_2\beta_1$ , um eine LTP zu induzieren (Taqatqeh et al. 2009; Haghikia et al. 2007). Dieses Ausbleiben der LTP in beiden *Knock-out*-Stämmen zeigt, dass das von der einen Isoform gebildete cGMP nicht das cGMP der anderen Isoform ersetzen kann. Dies spricht für eine Kompartimentierung der NOsGC Isoformen und des cGMP-Signals (Taqatqeh et al. 2009).

Die Bahnung bei doppelter Stimulation (*paired-pulse facilitation*, PPR) ist ein Maß für präsynaptische Transmitterfreisetzung. Dabei bedeutet eine geringere PPR, dass ein Großteil der Neurotransmitter enthaltenden Vesikel schon bei dem ersten Stimulus „verbraucht“ wurde, also eine Zunahme der Wahrscheinlichkeit für präsynaptische Neurotransmitterfreisetzung. Die PPR ist in glutamatergen Synapsen im Hippocampus von Wildtyp- und  $\alpha_2$ -*Knock-out*-Mäusen vergleichbar (Taqatqeh et al. 2009);  $\alpha_1$ -*Knock-out*-Mäuse zeigten hingegen eine gesteigerte PPR, was für eine reduzierte präsynaptische Transmitterfreisetzung in  $\alpha_1$ -*Knock-out*-Mäusen spricht (Taqatqeh et al. 2009; Zucker 1989). Dies deutet darauf hin, dass die Isoform  $\alpha_1\beta_1$  in glutamatergen Synapsen im Hippocampus präsynaptisch lokalisiert ist und dort die Freisetzung von Glutamat stimuliert (Abbildung 2). Auch in GABAergen Synapsen zwischen Interneuronen und Pyramidenzellen konnte über Antikörperfärbung und *in situ* Hybridisierung eine unterschiedliche Lokalisation der NOsGC Isoformen nachgewiesen werden (Szabadits et al. 2007).



**Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung einer glutamatergen Synapse mit wahrscheinlicher Lokalisation der am NO/cGMP-Signalweg beteiligten Proteine**

Durch Aktivierung der neuronalen NO-Synthase (nNOS) wird NO gebildet, welches als retrograder Botenstoff in der Präsynapse die Transmitterfreisetzung erhöht. Dabei übernehmen die Isoformen der NO sensitiven Guanylat-Cyclase (NOsGC) unterschiedliche Aufgaben. Von der postsynaptisch lokalisierten nNOS gebildetes NO diffundiert in die Präsynapse und aktiviert die NOsGC-Isoform  $\alpha_1\beta_1$ . Von ihr gebildetes cGMP vermittelt über HCN-Kanäle (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel) eine vermehrte Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat (rote Fünfecke). Glutamat führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Postsynapse, der erneut die nNOS aktiviert. Das von der nNOS gebildete NO aktiviert auch die postsynaptisch lokalisierte NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$ . Neben der nNOS ist auch die eNOS an der Signaltransduktion beteiligt. Sie bildet NO, das in die Präsynapse diffundiert und die Isoform  $\alpha_1\beta_1$  aktiviert. Erweitert nach Russwurm et al. (2013).

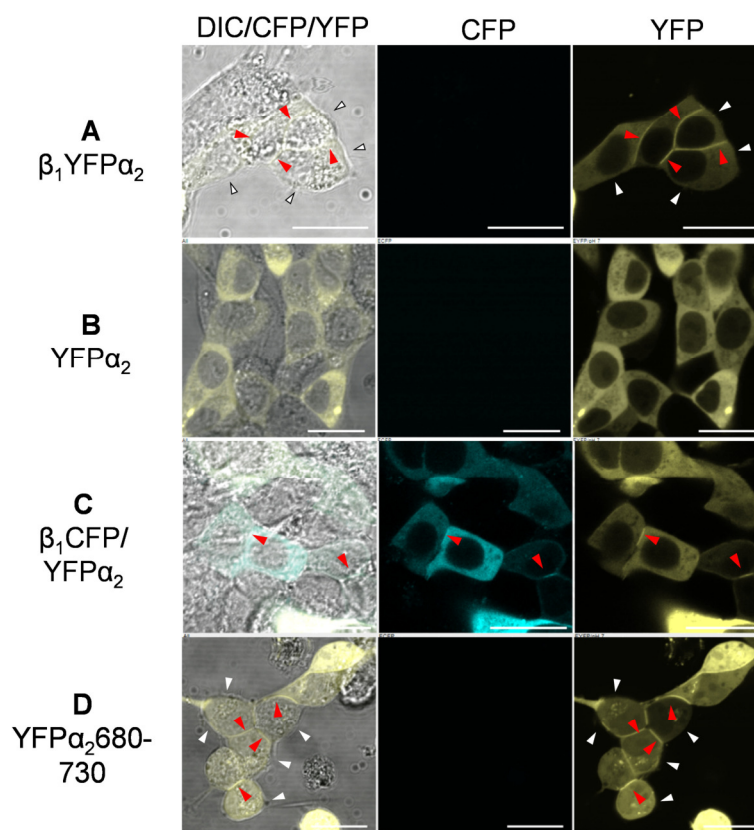
### 1.3.2 Membranäre Lokalisation der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$

Im Gegensatz zu der  $\alpha_1$ - Untereinheit endet die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC carboxyterminal in einem PDZ-Bindemotiv (Aminosäuresequenz: -RETSL). Über die Interaktionen zwischen PDZ-Domänen und PDZ-Bindemotiven setzen sich größere Proteinkomplexe zusammen. PDZ-Domänen sind nach den ersten Proteinen, in denen diese Domänen identifiziert wurden, benannt: PSD-95 (für *post synaptic density*), Disc Large und Zona Occludes-1 (Fanning und Anderson 1999). Die aus ca. 90 Aminosäuren bestehenden PDZ-Domänen binden an PDZ-Bindemotive des Interaktionspartners, die sich wie auch bei der  $\alpha_2$ -Untereinheit häufig an dessen Carboxyterminus befinden (Doyle et al. 1996; Hoffmüller et al. 1999). Russwurm et al. konnten zeigen, dass die Isoform  $\alpha_2\beta_1$  über das RETSL-Motiv mit der dritten PDZ-Domäne des Gerüstproteins PSD-95 interagieren kann (Russwurm et al. 2001). PSD-95 gehört zu der Klasse der MAGUK-Proteine (*Membrane-associated guanylate kinase*). Es kommt fast ausschließlich in der postsynaptischen Dichte vor. Die postsynaptische Dichte ist ein komplexes Proteinnetzwerk, das in den dendritischen Dornen exzitatorischer Neuronen mit der postsynaptischen Membran verknüpft ist (Kennedy 2000). Über dieses Netzwerk aus Gerüstproteinen sind postsynaptische Rezeptormoleküle in der postsynaptischen Membran verankert. Russwurm postuliert eine Rekrutierung der  $\alpha_2$ -Untereinheit zur synaptosomalen Membran, hervorgerufen durch die Interaktion mit PSD-95 oder den PSD-95-ähnlichen Proteinen PSD-93, SAP-97 und SAP-102 (SAP für *synaptic associated protein*). Durch Lenkung der NOsGC zur postsynaptischen Dichte kommt es zur Bildung eines membranären cGMP-Kompartiments. Die räumliche Nähe zu membranären Zielstrukturen und ein verminderter Abbau von cGMP durch Phosphodiesterasen führen dazu, dass das Signal besonders effektiv übermittelt werden kann (Bellingham und Evans 2007).

Eine membrannahe Lokalisation der NOsGC wurde auch in anderen Zusammenhängen beobachtet: Mit spezifischen Antikörpern sowohl gegen die  $\alpha_2$ -Untereinheit als auch gegen das Heterodimer  $\alpha_1\beta_1$  konnte eine Lokalisation an der neuromuskulären Endplatte in menschlichem Skelettmuskel nachgewiesen werden (Schoser und Behrends 2001). Zabel et al. berichten von einer calciumabhängigen Lokalisation der Isoform  $\alpha_1\beta_1$  an der Membran von Thrombozyten (Zabel et al. 2002).

In unserer Arbeitsgruppe wurden die einzelnen Untereinheiten der NOsGC mit Fluoreszenzproteinen fusioniert. So konnte nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen die Lokalisation der NOsGC in diesen Zellen untersucht werden. Neben den fluoreszenzmarkierten einzelnen NOsGC-Untereinheiten entstand auch ein Fusionskonstrukt, bei dem der Carboxyterminus der  $\beta_1$ -Untereinheit über das Fluoreszenzprotein YFP (gelb fluoreszierendes Protein)

mit dem Aminoterminus der  $\alpha_2$ -Untereinheit verbunden ist (Haase 2010). Das entstandene Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  stellt ein erzwungenes Heterodimer der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  dar, das katalytische Aktivität aufweist (Haase 2010). In HEK293-Zellen liegt dieses Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an Zell-Zell-Kontakten vor: An Membranabschnitten, die direkten Kontakt zu Nachbarzellen haben, ist ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal zu detektieren als an Membranabschnitten, die keinen Kontakt zu Nachbarzellen haben (Haase 2010). Tobias Haase konnte zeigen, dass diese Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation über das PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit zustande kommt. Mareike Busker setzte die Charakterisierung der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC fort: Während die allein transfizierte YFP-markierte  $\alpha_2$ -Untereinheit cytosolisch vorliegt, führt eine Koexpression von YFP $\alpha_2$  mit  $\beta_1\text{CFP}$  zu einer Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Heterodimers. Ebenfalls am Zell-Zell-Kontakt lokalisiert ist eine verkürzte Version der  $\alpha_2$ -Untereinheit, die nur aus den letzten 50 Aminosäuren des  $\alpha_2$ -Carboxyterminus und dem Fluoreszenzprotein besteht (Aminosäuren 680-730; Nummerierung Ratte, siehe Abbildung 3 A-D).



**Abbildung 3: Lokalisation der fluoreszenzmarkierten NOsGC-Konstrukte in HEK293-Zellen**

Konfokale Laser-Scanning mikroskopische Aufnahme von HEK293-Zellen, die transient mit (A)  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ , (B) YFP $\alpha_2$  allein, (C)  $\beta_1\text{CFP}$  zusammen mit YFP $\alpha_2$  oder (D) dem Carboxyterminus von  $\alpha_2$  (YFP $\alpha_2$ 680-730) transfiziert worden sind. Rote Pfeile markieren fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte, weiße Pfeile markieren Membranabschnitte, die keine direkte Nachbarzelle haben. Der Balken stellt 50  $\mu\text{m}$  dar. Eigene Aufnahmen mit den Konstrukten und nach den Ideen von Tobias Haase und Mareike Busker (Haase 2010; Busker 2013).

## 2 Zielsetzung

Im Gegensatz zu der NOsGC-Isoform  $\alpha_1\beta_1$  liegt die Isoform  $\alpha_2\beta_1$  in HEK293-Zellen spezifisch an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert vor. Ziel dieser Arbeit ist es, diese subzelluläre Lokalisation genauer zu charakterisieren.

### 2.1 Regulation der subzellulären Lokalisation über Phosphorylierung

Die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Fusionskonstruktes  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in HEK293-Zellen unterliegt einer dynamischen Regulation (Busker 2013). Doch welche Mechanismen zur Lokalisation am Zell-Zell-Kontakt beitragen, ist bis heute nicht bekannt. Im ersten Teil der Arbeit soll der Einfluss möglicher Phosphorylierungen der NOsGC auf die subzelluläre Lokalisation des Enzyms untersucht werden.

### 2.2 Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation vermittelnder direkter Interaktionspartner

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation desjenigen Interaktionspartners der  $\alpha_2$ -Untereinheit, der für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$  verantwortlich ist. Die bereits identifizierten Interaktionspartner PSD-95 und Scribble (Russwurm et al. 2001; Ivarsson et al. 2014) sind nicht an dieser besonderen Lokalisation in HEK293-Zellen beteiligt (Busker 2013). Die Identifikation des Interaktionspartners bietet möglicherweise weitere Einblicke in die Rolle, die die NOsGC am Zell-Zell-Kontakt spielt.

### 2.3 Charakterisierung des Zell-Adhäsionssystems

Nach Identifikation des direkten Interaktionspartners der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  soll das gesamte Zell-Adhäsionssystem untersucht werden, das die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$  vermittelt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Hilfsmittel und Geräte

##### *Allgemein*

Analysenwaage BP 210 D	Sartorius (Göttingen)
Gefrierschrank, -80 °C Typ 6485	GFL (Burgwedel)
Gefrierschrank, -20 °C GNP 3376	Liebherr (Ochsenhausen)
Gefriertruhe, -152 °C Ultra low MDF 1156	Sanyo (Bad Nenndorf)
Heizblock mit Schüttelfunktion Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Kleinschüttler MS 3 basic	IKA (Staufen)
Kleinschüttler Vortex-Genie <sup>®</sup> 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Kühlschrank, +4 °C GKv 6410	Liebherr (Ochsenhausen)
Magnetrührer RCT basic	IKA (Staufen)
Mehrfachdispenser HandyStep <sup>®</sup> electronic	Brand (Wertheim)
Mikroplattenleser Sunrise <sup>™</sup>	Tecan (Männedorf, CH)
Mikrowaage XS3DU	Mettler Toledo (Gießen)
Mikrozentrifuge Fresco 21	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Minizentrifuge GMC-060	LMS (Brigachtal)
Multiwellplatten Sensoplate, 24 well mit Glasboden	Greiner bio-one (Frickenhäusen)
Netzgerät für Elektrophorese-PowerPac 300 Apparaturen	Bio-Rad (München)
pH-Meter766 Calimatic <sup>®</sup>	Knick (Berlin)
Pipette Research 10	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten PIPETMAN <sup>®</sup> P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson (Middelton, USA)
Pipettierhilfe Pipetus <sup>®</sup>	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Präzisionswaage PT 210	Sartorius (Göttingen)
Reinstwasseranlage PURELAB flex	Veolia Water Technologies (Celle)
µ-Dish (IbiTreat)	Ibidi, München
Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H	Bandelin (Berlin)
Universalofen UF 160	Memmert (Schwabach)
UV/VIS-Spektrophotometer NanoPhotometer <sup>™</sup>	Implen (München)
Wasserbad Typ 1003	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)

##### *Molekularbiologische Arbeiten*

Elektrophorese-Apparatur horizontal SciePlas H3-SET	Herolab (Wiesloch)
Elektrophorese-Apparatur horizontal Subcell <sup>®</sup> GT <sup>®</sup>	Bio-Rad (München)
Geldokumentationssystem Gel IX Imager	Intas (Göttingen)



Inkubationsschrank Kelvitron® t	Heraeus (Hanau)
Reaktionsgefäße für DNA-Proben DNA LoBind Tube®	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler Primus 25 advanced	Peqlab (Erlangen)

#### *Proteinbiochemisches Arbeiten*

Blotting Papier Whatman 3MM Chr Blotting Paper	GE Healthcare (Freiburg)
ECL Dokumentationsanlage ChemiLux	Intas (Göttingen)
Elektroblotter, halbtrocken Sedec™ M	Peqlab (Erlangen)
Elektrophorese-Apparatur vertikal Mini-PROTEAN®	Bio-Rad (München)
Netzgerät für Elektroblotter EV231	Peqlab (Erlangen)
Nitrocellulose Membran Amersham™Hybond™ 0,2 µm	GE Healthcare (Freiburg)
Reaktionsgefäße Protein LoBind Tube®	Eppendorf (Hamburg)
Scannersystem A4 ViewPix 700	Biostep (Burkhardtsdorf)
Taumelschüttler WT 12	Biometra (Göttingen)
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus HD2070	Bandelin (Berlin)

#### *Zellkultur*

Absaugsystem für biologische Flüssigkeitsabfälle Vacuase comfort	Integra Bioscience (Fernwald)
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-18 AC	Sanyo (Bad Nenndorf)
Invertoskop ID03	Zeiss (Jena)
Reinraumwerkbank Herasafe™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Reinraumwerkbank LaminAir® HB 2472	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

#### *Mikroskop*

Argon-Laser 457-514 nm, 40 mW	Melles Griot (Carlsbad, USA)
Inverses, konfokales Laser-Scanning Mikroskop-System Nikon Eclipse Ti mit A <sub>1</sub> -System	Nikon Europa (Amsterdam, NL)
Klimasystem für Ti-E A1 Mikroskopkammer H201 Temperatureinheit H201-T	Okolab (Ottaviano; IT)
Objektiv für Ti-E Mikroskop CFI Planapochromat VC 60x Öl, N.A. 1, 4	Nikon Europa (Amsterdam, NL)

Einwegmaterialien wie Zellkulturflaschen, Spitzen, Reaktionsgefäße und Pipetten wurden von Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

#### 3.1.2 Chemikalien und Substanzen

Agar Kobe I	AppliChem (Darmstadt)
Agarose low EEO	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Merck (Darmstadt)
cOmplete™ Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche (Mannheim)
D-Glucose-Monohydrat	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck (Darmstadt)
Dithiotreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
DNA-Größenstandard GeneRuler™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
1 kb DNA Ladder	Merck (Darmstadt)
Essigsäure 96 %	Berkel AHK (Ludwigshafen)
Ethanol entwässert, vergällt mit 1 % Petrolether	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, USA)
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Bio & Sell (Feucht bei Nürnberg)
Fetales Rinderserum (FBS) Gold ADD	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin 100 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Carl Roth (Karlsruhe)
HEPES	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kanamycin 50 mg/ml	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lysozym aus Hühnereiweiß	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumacetat, wasserfrei	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem (Darmstadt)

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Natriumhydroxid-Plättchen (NaOH)	Merck (Darmstadt)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Gibco™ (Waltham, USA)
PageRuler™ Unstained Protein Ladder (10-200 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Gibco™ (Waltham, USA)
Penicillin-Streptomycin 100 x (10000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific, Gibco™ (Waltham, USA)
Polyethylenimin, linear, MW 25000	Polyscience (Warrington, USA)
Ponceau-S	Carl Roth (Karlsruhe)
Protein A Sepharose Beads CL-B4	GE Healthcare (Freiburg)
RNase A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Roti®-Quant (5 x Konzentrat)	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure 37% (HCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Triethanolamin-Hydrochlorid (TEA/HCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris für Pufferlösungen	AppliChem (Darmstadt)
Triton-X 100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin-EDTA 10 x	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Xylenglycol	Carl Roth (Karlsruhe)

Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs® (Ipswich, USA) bezogen.

### 3.1.3 Reagenziensysteme

Fast Gene® Xpress Plasmid Kit	Nippon Genetics Europe, Dören
Lipofectamine® LTX mit PLUS™ Reagent	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™ (Waltham, USA)
Lipofectamine® RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™ (Waltham, USA)
LumiLight <sup>PLUS</sup> Western Blotting Substrate	Roche (Mannheim)
PureLink® HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™ (Waltham, USA)
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit®	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

#### *Molekularbiologische Methoden*

Ampicillin	100mg/ml
DNA-Ladepuffer (6x)	10 mM Tris, 60 mM EDTA, 60 % Glycerin, 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol, pH 7,6
Lösung I	50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0, 0,1 % RNase, 0,2 % Lysozym frisch dazu
Lösung II	0,2 M NaOH, 1 % SDS (w/v)
Lösung III	3 M Kaliumacetat, 12 % Essigsäure 96 % (v/v)
NaOH	10 mM
TRIS-Acetate-EDTA (TAE)-Puffer	2 M Tris, 1 M Essigsäure 96 %, 0,05 M EDTA, pH 7,6. 1:50 Verdünnung
50 x Stammlösung	

#### *Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur*

Bradfordreagenz	20% Roti <sup>®</sup> -Quant, 80% Reinswasser
IP-Lysispuffer	PBS mit cOmplete <sup>™</sup> Protease Inhibitor
IP-Probenpuffer	30 % Glycerin (v/v), 100 mM DTT , 1 % SDS (w/v), 50 mM Tris, pH 7,5
PEI-Transfektionslösung	1 mg/ml PEI, pH 7,4, steril
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1 x	150 mM NaCl, 5,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4, steril
Ponceau-S-Färbelösung	1 % Essigsäure 96 % (v/v), 0,5 % Ponceau-S
Sammelgel 5 % (Angaben pro Gel)	2,5 ml Sammelgel-Puffer 2 x, 1 ml Rotiphorese <sup>®</sup> - Gel 30, 1,45 ml Reinstwasser, 60 µl APS 10 %, 6 µl TEMED
Sammelgel-Puffer 2 x	0,25 M Tris, 0,2 % SDS (w/v), pH 6,8
SDS-Laufpuffer 10 x	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1 % SDS (w/v), pH 8,3–8,8
Sucrose-Puffer	0,32 M Glucose, 1mM EDTA, 2mM 1,4-dithiothreitol, 10 mM HEPES, pH 7.4 mit cOmplete <sup>™</sup> Protease Inhibitor
TEA-Lysis-Puffer	50 mM TEA, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7,4 mit cOmplete <sup>™</sup> Protease Inhibitor
Transfer-Puffer 10 x	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 0,2 % SDS (w/v), pH 8,3
Trenngel 10 % (Angaben pro Gel)	3 ml Reinstwasser, 2,5 ml Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30, 1,9 ml Trenngel-Puffer 4 x, 75 µl APS 10 %, 7,5 µl TEMED
Trenngel 15 % (Angaben pro Gel)	1,75 ml Reinstwasser, 3,75 ml Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30, 1,9 ml Trenngel-Puffer 4 x, 75 µl APS 10 %, 7,5 µl TEMED
Trenngel-Puffer 4 x	1,5 M Tris, 0,4 % SDS (w/v), pH 8,8

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (TBST)-Puffer 10 x	1,5 M NaCl, 100 mM Tris, 1 % Tween 20 (v/v)
Triton-X 100 Stammlösung 20%	20% Triton-X 100, 80% PBS

### 3.1.5 Zellen

#### *Prokaryotische Zellen*

dam <sup>-</sup> /dcm <sup>-</sup> kompetente <i>E. coli</i>	New England Biolabs <sup>®</sup> (Ipswich, USA)
One Shot <sup>®</sup> TOP 10 competent cells	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen <sup>™</sup> (Waltham, USA)

#### *Eukaryotische Zellen*

HEK293	Leibniz-Institut DSMZ–Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig)
--------	---

Cytosole der Zelllinien MDCK, Caco-2 und PC12 wurden von Ines Thomsen zur Verfügung gestellt.

### 3.1.6 Verwendete Medien

DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose</i> , HEPES, ohne Phenolrot)	Thermo Fisher Scientific, Gibco <sup>™</sup> (Waltham, USA)
LB ( <i>Lysogeny Broth</i> )-Medium	1 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), 1 % Natriumchlorid (w/v), pH 7,0 +Ampicillin 0,1 mg/ml oder Kanamycin 0,05 mg/ml bei Bedarf + 1,5 % Agar
Opti-MEM <sup>®</sup> Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, USA)
SOC ( <i>Super Optimal Broth</i> )-Medium	20 mM Glucose, 10 mM Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 2,5 mM Kaliumchlorid, 1 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), pH 6,7 - 7

### 3.1.7 Tierhaltung und Organentnahme

Bei den verwendeten Versuchstieren handelt es sich um NMRI (*Naval Medical Research Institut*) Mäuse, die in der zentralen Einrichtung für Tierhaltung der TU Braunschweig gezüchtet und gehalten wurden. Wasser und Trockenfutter standen *ad libitum* zur Verfügung. Für die beschriebenen Versuche wurden weibliche adulte Mäuse zwischen 12 und 22 Wochen durch Dekapitation getötet. Gehirne wurden entnommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.1.8 Antikörper

#### *primäre Antikörper*

anti-GFP Living Colors <sup>®</sup> polyklonal, Kaninchen (1:2000)	Takara Bio/Clontech (Saint-Germain-en-Laye, FR)
anti-GFP, 11814460001 monoklonal, Maus (1:1000)	Roche (Mannheim)
anti-Lin7a PAS-30871, Kaninchen (1:5000)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
anti-MPP3 ab96235, Kaninchen (1:1000)	Abcam (Cambridge, UK)
anti-Nectin-1 monoklonal 37-5900, Maus (1:1000)	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen <sup>™</sup> (Waltham, USA)
anti-NOsGC- $\alpha_1$ G4280 Kaninchen (1:5000)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
anti-NOsGC- $\alpha_2$ Kaninchen EP073512 (1:500)	Antikörperanreinigung wie bei (Bamberger 2001), 11/2008, als Epitop verwendetes Peptid: LGSDYLETSPEEEGEC
anti-NOsGC- $\alpha_2$ Kaninchen EP073513, (1:2000)	Antikörperanreinigung wie bei (Bamberger 2001), 11/2008, als Epitop verwendetes Peptid: PKPPKPSLSSSRIKKC
anti-NOsGC- $\beta_1$ (SN15, G4530), Kaninchen (1:4000)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
anti-Scribble 4475, Kaninchen (1:1000)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)

#### *sekundäre Antikörper*

anti-Kaninchen IgG HRP-verlinkt, Ziege (1:2000)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
anti-Maus IgG HRP-verlinkt, Pferd (1:2000)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)

## 3.1.9 DNA-Konstrukte

<i>Konstrukt</i>	<i>Vektor</i>	<i>Herkunft</i>
YFP $\alpha_2$	pEYFP-C1	(Haase et al. 2010c)
$\beta_1$ YFP $\alpha_2$	pEYFP-C1	(Haase et al. 2010c)
$\beta_1$ YFP $\alpha_2$ RETAL	pEYFP-C1	Mutagenese 3.2.6.1
$\beta_1$ YFP $\alpha_2$ RETDL	pEYFP-C1	Mutagenese 3.2.6.1
$\beta_1$ (Y192F)YFP $\alpha_2$	pEYFP-C1	Mutagenese 3.2.6.1
$\beta_1$ CFP	pECFP-N1	(Haase et al. 2010c)
$\beta_1$ (Y192F)CFP	pECFP-N1	Mutagenese 3.2.6.1
$\beta_1\alpha_2$ (ohne Fluoreszenzprotein)	pEYFP-C1	kloniert von Nadine Haase
$\beta_1\alpha_2$ RETSR	pEYFP-C1	Mutagenese durchgeführt von Ines Glöckner
$\beta_1\alpha_2\Delta$ ETSL	pEYFP-C1	Mutagenese 3.2.6.5
GFP-Lin7a (human)	pEGFP-C1	Chishti von der Tufts University, Massachusetts (USA)
CFP-Lin7a	pECFP-C1	Klonierung 3.2.5.1
YFP-Lin7a	pEYFP-C1	Klonierung 3.2.5.1
CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ	pECFP-C1	Klonierung 3.2.5.2
CFP-Lin7a $\Delta$ L27	pECFP-C1	Klonierung 3.2.5.3
Lin7a	pEYFP-C1	Klonierung 3.2.5.4
Lin7a $\Delta$ PDZ	pECFP-C1	Klonierung 3.2.5.4
Lin7a $\Delta$ L27	pECFP-C1	Klonierung 3.2.5.4
Nectin-1 (human)	pcDNA-3	Praticia G. Spear, Northwestern University, Chicago, USA
Nectin-1CFP $\Delta$ EWYV	pECFP-N2	Klonierung 3.2.5.6
Nectin-1YFP $\Delta$ EWYV	pEYFP-N2	Klonierung 3.2.5.6
Nectin-1CFP	pECFP-N2	Klonierung 3.2.5.6
Nectin-1 $\Delta$ EWYV	pcDNA-3	Mutagenese 3.2.6.4
Nectin-1 $\Delta$ 13AS	pcDNA-3	Mutagenese 3.2.6.4
MPP3	pcDNA3.1/V5/HisTOPO	Klonierung 3.2.5.7 durchgeführt von Sönke Behrends
MPP3-YFP	pEYFP-N1	kloniert von Nadine Haase
CFP-MPP3	pEYFP-C1	Klonierung 3.2.5.7
YFP-MPP3	pEYFP-C1	Klonierung 3.2.5.7
YFP-MPP3 $\Delta$ C578-585	pEYFP-C1	Mutagenese 3.2.6.2
YFP-MPP3LG144/145AE	pEYFP-C1	Mutagenese 3.2.6.3
N-Cadherin-GFP	pEGFP-N1	Valerie Vasioukhin, Addgene Plasmid #18870
N-Cadherin-YFP	pEYFP-N1	Klonierung 3.2.5.5
Scrib-YFP	pEYFP-N1	(Haase 2010)
YFP-PSD-95	pEYFP-N1	(Haase 2010)
Claudin-1-CFP	pECFP-N1	Jörg Piontek, Charité, Berlin

## 3.1.10 Oligonucleotide

Nr.	Primername		Sequenz
218	dlgh3	sense	5'-ctg ggg acc tgc tgg gca cag-3'
219		anti	5'-gag cgt gga ctc gag ggt ctt caa g-3'
445	a2 S729A	sense	5'-tgg cac gat gtt cct ccg aga aac tgc cct ctg aga ttt g-3'
446		anti	5'-caa atc tca gag ggc agt ttc tcg gag gaa cat cgt gcc a-3'
479	a2 S729D rat	sense	5'-tgg cac gat gtt cct ccg aga aac tga cct ctg aga ttt g-3'
480		anti	5'-caa atc tca gag gtc agt ttc tcg gag gaa cat cgt gcc a-3'
481	b1Y192F rat	sense	5'-gaa gaa aaa gaa tca aaa gaa gag gat ttt ttt gaa gat ctg gac agg -3'
482		anti	5'-cct gtc cag atc ttc aaa aaa atc ctc ttc ttt tga ttc ttt ttc ttc-3'
499	a2R728Q rat	sense	5'-ggc acg atg ttc ctc caa gaa act agc ctc tga-3'
500		anti	5'-tca gag gct agt ttc ttg gag gaa cat cgt gcc-3'
575	a2_E727 stop	sense	5'-gca cga tgt tcc tcc gat aaa cta gcc tct gag at-3'
576	(rat)	anti	5'-atc tca gag gct agt tta tcg gag gaa cat cgt gc-3'
581	YFP-MPP3	sense	5'-aag aat aag gag ccc gcg ggt gcc acc atc cg-3'
582	L144A	anti	5'-cgg atg gtg gca ccc gcg ggc tcc tta ttc tt-3'
583	YFP-MPP3	sense	5'-aag gag ccc gcg gag gcc acc atc cga c-3'
584	LG144/145AE	anti	5'-gtc gga tgg tgg cct ccg cgg gct cct t-3'
585	Lin7adPDZ	sense	5'-gct gta caa gtc cgg act gag ctc cat gct gaa gcc-3'
586	Eco53kl	anti	5'-ggc ttc agc atc atg gag ctc agt ccg gac ttg tag agc-3'
590	YFP-MPP3	sense	5'-ctg agc aag gac act tcc tag gta ccc atc ag-3'
589	_577	anti	5'-ctg atg ggt acc tag gaa gtg tcc ttg ctc ag-3
595	Nectin-1	sense	5'-ctt tca cct aga agt agt ggt acg tgt agc cg-3'
596	ΔEWYV	anti	5'_cgg cta cac gta cca cta ctt gga aat gaa ag-3'
597	Nectin-1	sense	5'-tga gaa cat ggt ttc tca gta gga cgg gtc ttt cat ttc ca-3'
598	Δ13AS	anti	5'-tgg aaa tga aag acc cgt cct act gag aaa cca tgt tct ca-3'

## 3.1.11 siRNA

Silencer Select <sup>®</sup> s16834 (Lin7a)	Thermo Fisher Scientific, Ambion <sup>™</sup> (Waltham, USA)
Silencer Select <sup>®</sup> s16835 (Lin7a)	Thermo Fisher Scientific, Ambion <sup>™</sup> (Waltham, USA)
Silencer Select <sup>®</sup> s23970 (Scribble)	Thermo Fisher Scientific, Ambion <sup>™</sup> (Waltham, USA)
Silencer Select <sup>®</sup> s23971 (Scribble)	Thermo Fisher Scientific, Ambion <sup>™</sup> (Waltham, USA)
Silencer Select <sup>®</sup> negative control siRNA #1	Thermo Fisher Scientific, Ambion <sup>™</sup> (Waltham, USA)
Silencer Select <sup>®</sup> negative control siRNA #2	Thermo Fisher Scientific, Ambion <sup>™</sup> (Waltham, USA)



### 3.1.12 Programme

NIS-Elements AR 4.13	Nikon Europa (Amsterdam, NL)
Citavi 5.4	Swiss Academic Software (Wädenswil, CH)
Clustal Omega	EMBL-EBI (Cambridgeshire, UK) (Sievers et al. 2011; Goujon et al. 2010)
NIS-Elements AR 4.13	Nikon Europa (Amsterdam, NL)
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Phosphosite <sup>®</sup> Plus	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK) (Hornbeck et al. 2015)
SigmaPlot 10.0	Systat Software GmbH (Erkrath)
Vektor NTI 11	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen <sup>™</sup> (Waltham, USA)

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Kompetenz beschreibt die Fähigkeit von Bakterien, fremde DNA aufzunehmen. Einige Bakterienstämme sind natürlich kompetent. Das stellte zuerst Griffith (Griffith 1928) bei dem Stamm *Streptococcus pneumoniae* fest, bevor DNA als Träger der Erbinformation überhaupt entdeckt worden war. Das Bakterium *E. coli* gehört nicht zu natürlich kompetenten Zellen und wurde darum mit Calciumchlorid perforiert, um es so für DNA aufnahmefähig zu machen.

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurde LB Medium mit einer Übernachtskultur *E. coli* Top 10 angeimpft und bei 37 °C so lange schüttelnd inkubiert, bis die optische Dichte bei 595 nm 0,6 entsprach. Die Zellen wurden 15 Minuten auf Eis stehen gelassen und danach bei 4500 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in eiskalter Calciumchlorid-Lösung (100 mM) vorsichtig resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Überstand bei 4500 rpm abzentrifugiert und das entstandene Pellet in Calciumchlorid/Glyzerinlösung (100 mM / 20 %) resuspendiert, in Aliquots von 250 oder 550 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 3.2.2 Transformation

Die Transformation dient dem Einbringen von Plasmid-DNA und somit deren Vervielfältigung in Bakterien. Die chemisch kompetent gemachten *E. coli* Top 10 wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde ein Hitzeschock durchgeführt. Für 45 Sekunden wurden die Ansätze auf 42 °C erhitzt und anschließend 2 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Vermehrung der Bakterien folgten im Anschluss eine Zugabe von 250 µl SOC-Medium und eine Stunde Inkubation auf dem mit 300 rpm schüttelnden Heizblock bei 37 °C. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-

Agarplatten ausgestrichen, die ein Antibiotikum korrespondierend zu der Resistenz auf dem Plasmid enthielten. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### 3.2.3 *Plasmid isolation aus E. coli*

Für die Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien wurde unterschieden zwischen einer Präparation im kleinen und der Präparation im großen Maßstab. Die DNA-Präparation im kleinen Maßstab wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass bei Alkalisierung die große chromosomale DNA der Bakterien denaturiert, während die kleinere zirkuläre Plasmid-DNA nicht denaturiert und bei Neutralisierung wieder in Lösung gehen kann.

LB-Medium wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Jeweils 5 ml Medium wurden mit einer Bakterien-Kolonie beimpft, die die entsprechende Plasmid-DNA trug. Über Nacht wurden die Bakteriensuspensionen bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 2 ml der Übernachtskultur wurden in Reaktionsgefäßen abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 100 µl der Lösung 1 resuspendiert, der zuvor RNase und Lysozym zugesetzt worden waren. Lysozym beschädigt die Bakterienmembran und RNase baut die RNA ab. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden 200 µl der alkalischen Lösung 2 zugesetzt. Das in Lösung 2 enthaltene SDS zerstört die Zellen und die genomische DNA denaturiert. Es folgte eine weitere Inkubation von 10 Minuten und im Anschluss die Neutralisation durch 200 µl Lösung 3. Durch diese Zugabe präzipitierten Proteine zusammen mit dem SDS, Plasmid-DNA lag wieder gelöst vor. Nach einer weiteren Inkubation für 10 Minuten wurde der Ansatz bei 21000 g zentrifugiert, um das Präzipitat vom Überstand zu trennen. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 450 µl Isopropanol und 45 µl Natriumacetat-Lösung wurde die Plasmid-DNA gefällt und durch eine weitere Zentrifugation für 30 Minuten bei 21000 g pelletiert. Das entstandene Pellet wurde mit 500 µl 70 % igem Ethanol gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet und in 20 µl Reinstwasser aufgenommen.

Zur Isolation größerer Mengen DNA wurden 200 ml Übernachtskultur eingesetzt und die kommerziellen Präparations-Kits HiPure Plasmid Maxiprep® von Thermo Fischer und Fast Gene® Xpress Plasmid Kit von Nippon Genetics Europe verwendet. Die Präparationen erfolgten nach Herstellerangaben über Affinitätssäulen.

#### 3.2.4 *Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese*

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäurefragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei wandert durch die Phosphatreste negativ geladene DNA oder RNA durch die Poren des Agarosegels zur Anode. Kleinere Fragmente haben eine höhere Ge-

schwindigkeit und wandern darum weiter. Für die Herstellung eines 1 % igen Agarosegels wurden 4 g Agarose in 400 ml TAE-Puffer resuspendiert und in einer Mikrowelle bis zum Auflösen erhitzt. Die für die Größe des Gels erforderliche Menge dieser Agaroselösung wurde mit Ethidiumbromid versetzt und in eine Gießvorrichtung gegeben. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und kann diese so unter UV-Licht sichtbar machen. Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Ansätze mit verdauter DNA wurden mit Ladungspuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Im Anschluss wurde eine konstante Spannung von 80 V angelegt. Zur Abschätzung der Größe einzelner DNA-Banden wurde auf dem Gel zusätzlich ein Größenstandard (1 kb) aufgetrennt. Durch den negativ geladenen Ladungspuffer konnte die Lauffront während des Elektrophoresevorgangs abgeschätzt werden. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurden Bilder der Gele mit Hilfe einer UV-Kammer und des Geldokumentationssystems Gel IX Imager aufgenommen und interpretiert. Wenn die DNA-Fragmente für eine Klonierung benötigt wurden, wurde die entsprechende Bande aus dem Gel geschnitten und für 20 Minuten bei -80 °C eingefroren. Durch Herausdrücken des Puffers aus dem tiefgefrorenen Gelstück konnte die DNA wieder gewonnen und weiter verwendet werden.

### 3.2.5 Klonierung der verwendeten Konstrukte

Für die Klonierung der Konstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurde im Allgemeinen wie folgt verfahren: Die Plasmid-DNAs wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen im mitgelieferten Puffersystem nach Herstellerangaben geschnitten. Bei einem Verdau mit mehreren Enzymen wurde als Kontrolle auch jeweils ein Ansatz mit nur einem der Enzyme angesetzt. Meist wurde ein kleineres DNA Fragment, das Insert, in einen aufgeschnittenen Vektor eingebracht. Um bei der späteren Ligation eine Religation des Vektors ohne Insert zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste des Vektors durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase nach Herstellerangaben entfernt. Die durch den Verdau entstandenen DNA-Fragmente wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Einfrieren und Ausdrücken der entsprechenden Banden aus dem Gel isoliert (siehe 3.2.4). Um die DNA-Fragmente zu einem neuen Konstrukt miteinander zu verbinden, wurden unterschiedliche Verhältnisse an linearisiertem Vektor und Insert in einem Ansatz zusammen mit T4-Ligase nach Herstellerangaben inkubiert. Anschließend erfolgten eine Transformation und die Überprüfung der Klonierung durch Testverdau und Sequenzierung der DNA einzelner Klone.

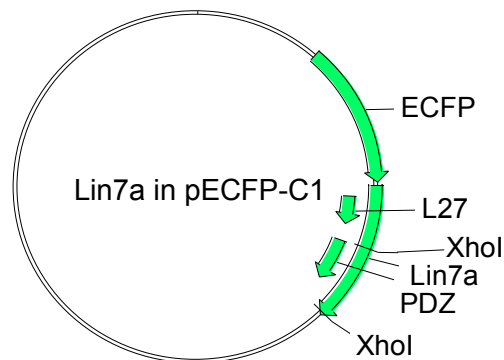
#### 3.2.5.1 CFP-Lin7a/YFP-Lin7a

GFP-Lin7a wurde freundlicherweise von Dr. Chishti von der Tufts University in Massachusetts zur Verfügung gestellt. Um Lin7a mit einem anderen Fluoreszenzprotein zu markieren,

wurde das Konstrukt mit den Restriktionsenzymen BspEI und BamHI verdaut. Das 773 Basenpaare (bp) große Stück, das für Lin7a codiert, wurden mit den Vektoren pEYFP-C1 und pECFP-C1 ligiert, die zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen aufgeschnitten worden waren.

### 3.2.5.2 CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ

Für das Deletionskonstrukt CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ wurde CFP-Lin7a mit dem Restriktionsenzym XhoI geschnitten. Die Positionen der Schnittstellen gehen aus Abbildung 4 hervor. Aus dem Verdau resultierten zwei DNA-Fragmente, ein 385 bp großes Stück, das für die PDZ-Domäne und den Carboxyterminus kodiert, und ein 5059 bp großes Stück mit dem Vektor inklusive Fluoreszenzprotein und aminoterminalen Bereich von Lin7a. Dieses längere Stück wurde zu CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ ligiert.



**Abbildung 4: Plasmid mit dem Konstrukt CFP-Lin7a.**

Domänen L27 und PDZ sind markiert. Das Fragment zwischen den XhoI Schnittstellen wurde für das Konstrukt CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ entfernt.

### 3.2.5.3 CFP-Lin7a $\Delta$ L27

Für das Lin7a Konstrukt, dem die L27-Domäne fehlt, wurde GFP-Lin7a mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Das kürzere Fragment maß 472 bp und kodierte für den carboxyterminalen Bereich von Lin7a inklusive der PDZ-Domäne, aber ohne Aminoterminal und L27-Domäne. Das Fragment wurde mit dem EcoRI aufgeschnittenen Vektor pEGFP-C2 ligiert. Im Anschluss wurde das GFP durch ein CFP ersetzt. Dafür wurden dieses Konstrukt und pECFP-C1 mit AgeI/BsrGI geschnitten. Das für CFP kodierende 726 bp große Stück wurde mit dem 4972 bp großen, die Sequenz für Lin7a $\Delta$ L27 enthaltenden Vektor ligiert.

### 3.2.5.4 Lin7a-Konstrukte ohne Fluoreszenzprotein

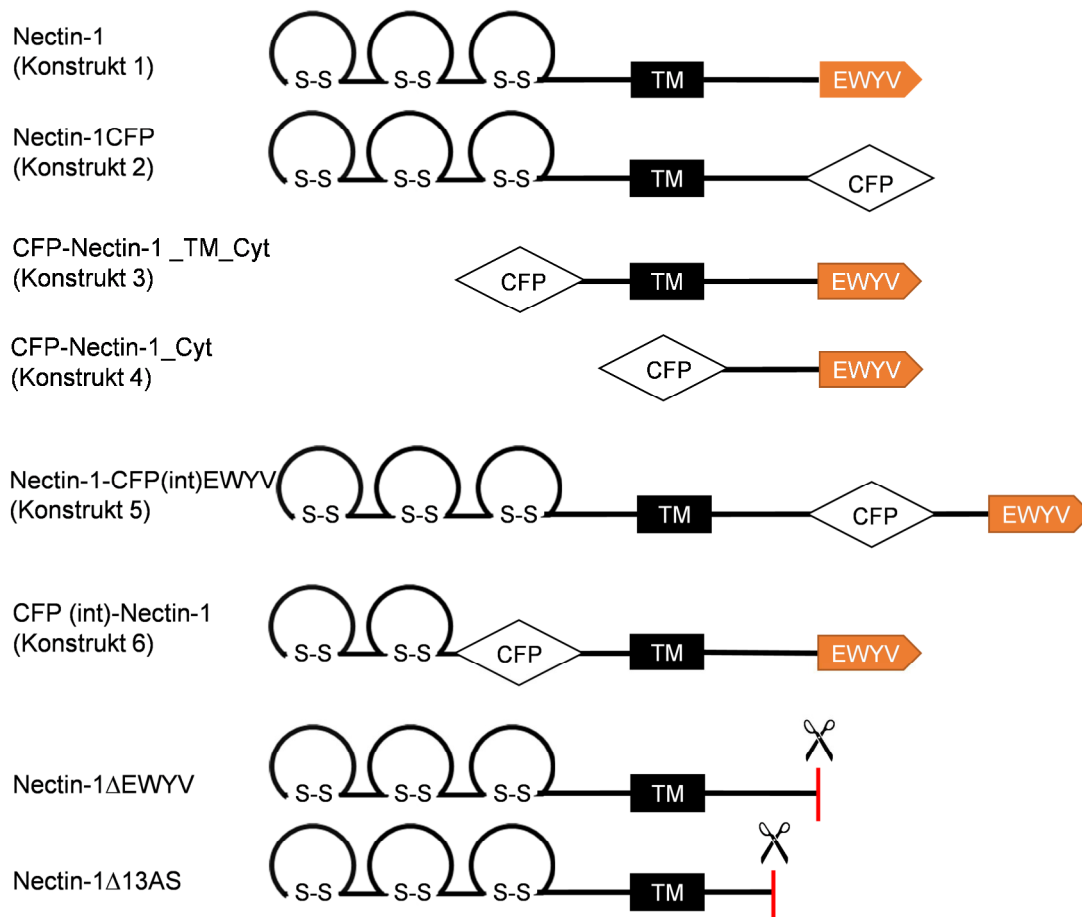
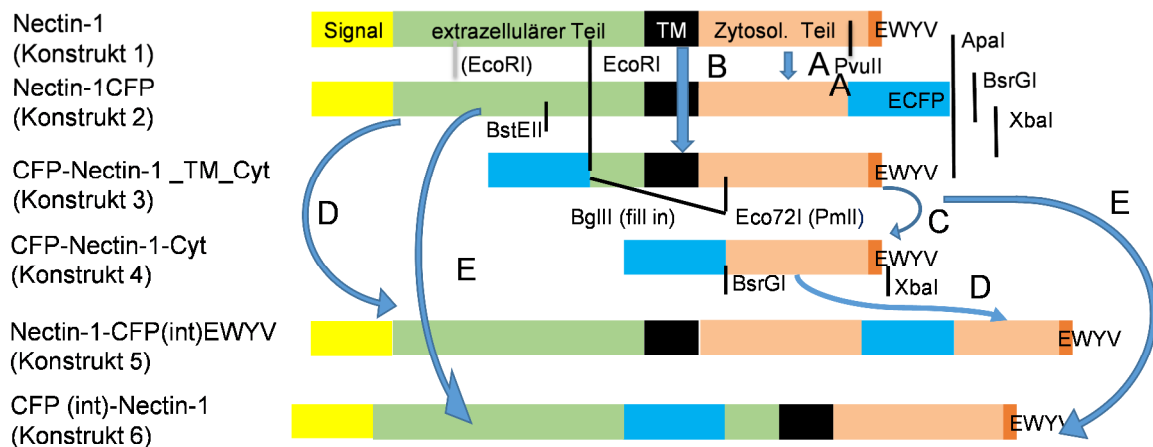
Um die oben beschriebenen Lin7a-Konstrukte in Immunopräzipitationen einsetzen zu können, wurde jeweils eine Variante des Konstruktes ohne Fluoreszenzprotein kloniert. YFP-Lin7a wurde mit AgeI und BspEI aufgeschnitten. Das längere, 4714 bp lange Fragment wurde zu

Lin7a in pEYFP ohne YFP religiert. In den Vektor CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ wurde zunächst mit den Primern 585 und 586 eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Eco53kl eingebracht. Das resultierende Plasmid wurde AfeI/Eco53kl geschnitten und das längere, 4315 bp große Stück religiert. Lin7a $\Delta$ L27 wurde mit den gleichen Enzymen AfeI/Eco53kl geschnitten und ohne den Teil, der für das Leuchtprotein kodiert, religiert.

#### 3.2.5.5 *N-Cadherin-YFP*

N-Cadherin-EGFP wurde über die Plattform Addgene von Valerie Vasioukhin zur Verfügung gestellt (Plasmidnummer #18870). EGFP wurde mithilfe der Restriktionsendonucleasen ApaI und BsrGI durch YFP ersetzt.

### 3.2.5.6 Nectin-1-Konstrukte



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Nectin-1-Konstrukte**

Oben: Schematische Darstellung der Gensequenz der Nectin-Konstrukte 1 bis 6 zur Veranschaulichung der Klonierungsstrategie. Ausgehend von humanem Nectin in pcDNA3 wurden Konstrukte kloniert, bei denen CFP an unterschiedlichen Stellen in das Protein eingefügt ist. Unten: Schematische Darstellung der entsprechenden Proteine. Die Konstrukte Nectin-1ΔEWYV und Nectin-1Δ13AS entstanden durch ein durch Mutagenese eingebrachtes Stopcodon an der entsprechenden Stelle (vgl. Kapitel 3.2.6.4).

Nectin-1 (human) in pcDNA-3 wurde freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Patricia G. Spear, von der Northwestern University in Chicago (schematische Darstellung in Abbildung 5, bezeichnet als Nectin-1, Konstrukt 1). Um ein carboxyterminal markiertes Nectinkonstrukt zu erhalten, wurde Nectin-1 (human) in pcDNA-3 mit BamHI und PvuII verdaut. Das Fragment, das für Nectin-1 codiert, wurde mit dem BglII/SmaI aufgeschnittenen Vektor pEGFP-N2 ligiert (entspricht Pfeil A in Abbildung 5). In einem zweiten Schritt wurde das GFP durch CFP aus pECFP-N1 beziehungsweise YFP aus pEYFP-N1 mithilfe der Restriktionsenzyme BamHI und BsrGI ausgetauscht. Dieser Schritt führte dazu, dass die Konstrukte nicht mehr im Leserahmen des Vektors waren. Um den Leserahmen zu verschieben, wurden diese Konstrukte mit BamHI aufgeschnitten und die Überhänge wurden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt (Nectin-1CFP, Konstrukt 2). Diesem Konstrukt 2 fehlt das carboxyterminale PDZ-Bindemotiv. Um ein aminoterminal fluoreszierendes Nectinkonstrukt untersuchen zu können, wurde Nectin-1 in pcDNA3 (Konstrukt 1) mit EcoRI und ApaI geschnitten. EcoRI schneidet zweimal in dem Teil des Gens, der für den extrazellulären Teil des Proteins codiert. Die für die Klonierung relevante Schnittstelle ist in Abbildung 5 in der Darstellung von Konstrukt 1 schwarz markiert, die nicht genutzte Schnittstelle ist grau eingezeichnet. Das 556 bp große Fragment, das für den carboxyterminalen Teil des Proteins codiert, wurde mit dem ApaI/EcoRI aufgeschnittenen Vektor pECFP-C2 ligiert (entspricht Pfeil B in Abbildung 5). Das daraus resultierende Konstrukt besteht aus dem Fluoreszenzprotein CFP, der transmembranären Domäne und dem cytosolischen Teil von Nectin-1. Es ist in Abbildung 5 dargestellt und wird als CFP-Nectin-1-TM-Cyt (Konstrukt 3) bezeichnet. Dadurch, dass der Aminoterminus bei dem Konstrukt nicht vorhanden ist, fehlt dem gebildeten Protein die Signalsequenz, die für den Einbau in die Zellmembran nötig ist.

Durch den Verdau dieses Konstrukts (Konstrukt 3) mit den Restriktionsenzymen BglII (Klenow fill in) und Eco72I und anschließende Religation des Vektors ist ein Konstrukt entstanden, das aus dem Fluoreszenzprotein und dem cytosolischen Teil von Nectin-1 besteht (Konstrukt 4, entspricht Pfeil C in Abbildung 5). Im Gegensatz zu Konstrukt 3 fehlt Konstrukt 4 die transmembranäre Domäne.

In einem weiteren Schritt wurde ein Nectinkonstrukt kloniert, das durch ein internes CFP innerhalb des cytosolischen Teils des Proteins markiert ist, bei dem also sowohl Carboxyterminus mit PDZ-Bindemotiv als auch Aminoterminus mit Signalsequenz intakt sind (Nectin-1-CFP(int)EWYV, Konstrukt 5). Dafür wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und BsgGI der Vektor mit Nectinkonstrukt 2 direkt hinter dem kodierenden Bereich aufgeschnitten. Konstrukt 4 wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Bei diesem zweiten Verdau

schneidet BsrGI zwischen CFP und dem Bereich, der für den Nectinteil kodiert. XbaI schneidet im Vektor hinter dem Konstrukt (Vergleiche Abbildung 5, Pfeile D). Der so ausgeschnittene Bereich von Konstrukt 4, der für den cytosolischen Bereich von Nectin-1 kodiert, wurde mit dem aufgeschnittenen Vektor, der das komplette Konstrukt 2 enthält, ligiert.

Ziel der letzten Klonierung in diesem Zusammenhang war ein Konstrukt, das genau wie Konstrukt 5 über intakten Amino- und Carboxyterminus verfügt, das Fluoreszenzprotein aber im extrazellulären Bereich enthält. Dafür wurde Konstrukt 3 mit AfeI und XbaI vollständig aus dem Vektor geschnitten. Es resultierte ein 1323 bp großes Fragment, das für Fluoreszenzprotein, transmembranäre Domäne und cytosolischen Teil von Nectin-1 kodiert. Das oben beschriebene Konstrukt 2 wurde mit BstEII linearisiert und die überhängenden Enden wurden mit der Klenow-Large-Fragment-DNA-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde der lineare Vektor mit XbaI geschnitten. Das 4788 bp große Stück dieses Verdaus, bestehend aus dem Vektor und dem aminoterminalen Bereich von Nectin-1, wurde mit dem 1323 bp großen Fragment aus Konstrukt 3 ligiert (Abbildung 5, Pfeile E). Ergebnis dieser Klonierung ist ein Konstrukt des Nectin-1, das anstelle der dritten extrazellulären Schleife ein internes CFP enthält; sowohl Amino- als auch Carboxyterminus sind intakt (CFP(int)-Nectin-1, Konstrukt 6).

Versuche mit Konstrukten 3, 4 und 5 wurden nicht mit in die Arbeit aufgenommen. Sie sind hier zur Vollständigkeit mit aufgeführt.



### 3.2.5.7 YFP-MPP3

MPP3 wurde mit den Primern 218 und 219 über PCR aus Maushirn gewonnen und in pcDNA3.1/V5/His-TOPO<sup>®</sup> kloniert. Die Sequenz von auf diesem Weg gewonnenem murinen MPP3 (Genbank accession number AAO65586) unterscheidet sich von zuvor kloniertem murinen MPP3 (Genbank accession number AF079366/AAD12762) und zeigt im Carboxyterminus eine höhere Homologie zu humanem MPP3 (vgl. Abbildung 6). Diese Arbeiten wurden 2003 von Sönke Behrends durchgeführt.

```

sp|Q13368|MPP3_HUMAN      SGAESPELLTYEEVARYQHQPGERPRLVVLIGSLGARLHELKQKVAENPQHFGVAVPHT
AAD12762.1                TGAESQVLLTYEEVARYQHQPGERPRLVVLIGSLGAHLHELKQRVVAEDPQQFAVAVPHT
AAO65586.1                TGAESQVLLTYEEVARYQHQPGERPRLVVLIGSLGAHLHELKQRVVAEDPQQFAVAVPHT
                          :***  *****:*****:*****:***:*.*****

sp|Q13368|MPP3_HUMAN      TRPRKSHEKEGVEYHFVSKQAFEADLHHNKFLHGEYKENLYGTSLEAIQAVMAKNKVCL
AAD12762.1                TRPRKSHEIDGVEYHFVSKQAFEADVHHNRFLEHGEYKENLYGTSLEAIQAVMAKNKVCL
AAO65586.1                TRPRKSHERDGEYHFVSKQAFEADVHHNKFLHGEYKENLYGTSLEAIQAVMAKNKVCL
                          ***** :*****:***:*****:*****:*****

sp|Q13368|MPP3_HUMAN      VDVEPEALKQLRTSEFKPYIIFVKPAIQERRKTPPMSPACEDTAAPFDEQQQEMAASAFAF
AAD12762.1                VDVEPEALRHLRTPFEFKPYVIFVKPAIQERRKTPPVSPDSEDIASSLDEQQQEMAASAFAF
AAO65586.1                VDVEPEALRHLRTPFEFKPYVIFVKPAIQERRKTPPVSPDSEDIASSLDEQQQEMAASAFAF
                          *****:.*.*****:*****:*****:*.** *: :*****

sp|Q13368|MPP3_HUMAN      IDRHYGHLVDVAVLVKEDLQGAYSQKLVVLEKLSKDTHWVPVSWVR
AAD12762.1                IDQHYGHLIDTVLVRQDLQEPAASSELS-----
AAO65586.1                IDQHYGHLIDTVLVRQDLQEACSQLRAVIETLSKDTSWVPISWVR
                          **:*****:*.***:*** :. .

```

**Abbildung 6: Alignment des carboxyterminalen Bereichs von humanem MPP3 und zwei verschiedener Sequenzen murinen MPP3s**

Das in dieser Arbeit verwendete MPP3 (AAO65586.1) zeigt im carboxyterminalen Bereich eine höhere Homologie zu der Sequenz humanen MPP3s als die zuvor eingereichte Sequenz (AAD12762.1). Blaue Striche markieren Beginn und Ende der GK-Domäne.

Der Vektor pEYFP-C1 wurde mit BglII geschnitten. Die Überhänge wurden mit der Klenow-Large-Fragment-DNA-Polymerase aufgefüllt. Danach wurde der Vektor mit SalI geschnitten. Aus dem Konstrukt MPP3 in HisTopo wurde die für MPP3 kodierende Sequenz mit ScaI und XhoI ausgeschnitten. Das 1792 bp große DNA-Fragment wurde mit dem Vektor zu YFP-MPP3 ligiert.

### 3.2.6 Mutagenese

Um einzelne Aminosäuren in einem Konstrukt auszutauschen, wurde das Reagenziensystem QuikChange<sup>®</sup> Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies verwendet. Dabei wird mit synthetisierten Oligonukleotiden, die die gewünschte Veränderung tragen, und dem Plasmid, das das zu mutierende Konstrukt beinhaltet, eine PCR durchgeführt. Im Anschluss wird die methylierte Ausgangs-DNA bei einem DpnI-Verdau zerschnitten, sodass nur neu synthetisierte und darum unmethylierte DNA übrig bleibt, die die gewünschte Mutation

trägt. Die Mutageneseansätze wurden transformiert und einzelne Klone nach DNA-Isolation mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

#### 3.2.6.1 *Mutationen zur Untersuchung möglicher Phosphorylierungen*

Sowohl zur Imitation als auch zur Verhinderung einer Phosphorylierung des Serins an Position 729 (Nummerierung Ratte) der  $\alpha_2$ -Untereinheit wurde jeweils eine Mutagenese durchgeführt (Dissmeyer und Schnittger 2011). Mit den Primern 445 und 446 wurde das Serin729 durch Alanin ersetzt, welches sich, weil eine entsprechende funktionelle Gruppe fehlt, nicht phosphorylieren lässt. Die Mutation wurde von Mareike Busker mit der YFP-markierten  $\alpha_2$ -Untereinheit und im Rahmen dieser Arbeit mit dem Fusionskonstrukt  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  ( $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ RETAL) durchgeführt. Asparaginsäure liegt unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vor und weist deshalb eine negative Ladung an der Carboxylgruppe auf. Die Eigenschaften dieser Aminosäure ähneln so dem am Phosphatrest negativ geladenen Phosphoserin. Mit den Primern 479 und 480 wurde das Serin729 der  $\alpha_2$ -Untereinheit im Konstrukt  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  ( $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ RETDL) durch die Asparaginsäure ersetzt. Mit den Primern 481 und 482 wurde auch in der  $\beta_1$ -Untereinheit eine Aminosäure ausgetauscht, um eine mögliche Phosphorylierung zu unterbinden. Das Tyrosin in Position 192 wurde zu einem Phenylalanin mutiert, welches in der para-Position keine Hydroxylgruppe besitzt und so nicht phosphoryliert werden kann. Die Mutagenese wurde sowohl in der CFP-markierten  $\beta_1$ -Untereinheit ( $\beta_1$ (Y192F)CFP) als auch in dem Fusionskonstrukt  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  ( $\beta_1$ (Y192F)YFP $\alpha_2$ ) durchgeführt.

#### 3.2.6.2 *YFP-MPP3\_577stop*

Durch das Einbringen eines Stopcodons in die Sequenz YFP-MPP3 wurde das Konstrukt carboxyterminal deletiert. Bei der Mutagenese mit den Primern 589 und 590 entstand ein Konstrukt, dem die letzten acht Aminosäuren fehlen (YFP-MPP3\_577stop).

#### 3.2.6.3 *YFP-MPP3\_LG144/145AE*

Durch zwei aufeinander folgende Mutagenesen des Konstruktes YFP-MPP3 mit den Primern 581 und 582 sowie 583 und 584 entstand YFP-MPP3\_LG144/145AE, eine Mutante, deren PDZ-Domäne nicht zur Bindung eines PDZ-Bindemotivs fähig ist (Petit, M. M. R. et al. 2005).

#### 3.2.6.4 *Carboxyterminal deletierte Nectin-1-Konstrukte*

Nectin-1 endet carboxyterminal mit einem PDZ-Bindemotiv. Um die Bedeutung dieses Motivs zu untersuchen, wurde mit den Primern 595 und 596 ein Konstrukt erstellt, das um die letzten vier Aminosäuren verkürzt wurde (Nectin-1 $\Delta$ EWYV). Mit den Primern 597 und 598

wurde ein Stopcodon in die Sequenz von Nectin-1 eingebracht, wobei ein um 13 Aminosäuren verkürztes Konstrukt entstand (Nectin-1 $\Delta$ 13AS).

#### 3.2.6.5 $\beta_1\alpha_2\Delta$ ETSL

Auch das PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit wurde deletiert. Dafür wurde eine PCR mit den Primern 575 und 576 und der Matrix  $\beta_1\alpha_2$  ohne Fluoreszenzprotein in pECFP-C1 durchgeführt. Dieses Konstrukt wurde von Andre Prause erstellt.

#### 3.2.7 Analyse der Plasmid-DNA

Die Konzentration der präparierten DNA wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung mit einem NanoPhotometer<sup>®</sup>. Über das Lambert-Beersche Gesetz wurde die DNA-Konzentration direkt vom Gerät ausgerechnet und angezeigt. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und bei 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Während Nucleinsäuren bei 260 nm absorbieren, steht bei Aminosäuren die Absorption bei 280 nm im Vordergrund. Ein Quotient von 1,8 entspricht dabei einer reinen DNA-Lösung. Dieser R-Wert wurde parallel vom NanoPhotometer<sup>®</sup> bestimmt und dokumentiert. Zur abschließenden Kontrolle der klonierten oder mutierten Vektoren wurde die DNA an die Firma GATC Biotech (Köln) geschickt, die Sanger Sequenzierungen durchgeführt hat.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden und Kultivierung eukaryotischer Zellen

#### 3.3.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die eukaryotische Zelllinie HEK293 ist adhärent wachsend und wegen ihrer unkomplizierten Handhabung sehr beliebt in der zellbiologischen Forschung. Die Zellen haben ihren Ursprung in humanem embryonalen Nierengewebe, nach dem sie auch benannt sind. Allerdings zeigen HEK293-Zellen keine für Nierengewebe typische Genexpressions-Signatur. Neben den Markern von renalen Progenitorzellen exprimieren HEK293-Zellen auch Proteine, die für neuronale Zellen oder die Nebenniere typisch sind (Shaw et al. 2002; Stepanenko und Dmitrenko 2015).

Die HEK293-Zellen wurden bei 37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM *high glucose* ohne Phenolrot kultiviert, das 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin enthielt. Zum Umsetzen der Zellen wurde das verbrauchte Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gespült, um Reste des alten Mediums zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Durch Zentrifugation wurde dieses Medium zusammen mit dem Trypsin entfernt. Das Zellpellet wurde erneut im Medium resuspendiert. Die Zellkultur wurde

mit einem Zehntel der Zellen weitergeführt. Der Rest der Zellen wurde für Versuche verwendet oder verworfen. Die HEK293-Zellen wurden alle drei bis vier Tage umgesetzt.

#### 3.3.2 *Proteinexpression in HEK293-Zellen*

Im Gegensatz zur Transformation, die das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterien beschreibt, bezeichnet Transfektion das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Für Versuche mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) oder Immunopräzipitationen mit überexprimiertem Protein wurden HEK293-Zellen transient mit Polyethylenimin (PEI) oder Lipofectamin LTX transfiziert. Für die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurden 100.000 Zellen in 500 µl Medium pro Loch in eine 24-Loch Platte ausgesät, welche einen Glasboden hat und so für die Mikroskopie geeignet ist. 24 Stunden nach dem Aussäen konnten die Zellen transfiziert werden.

PEI ist ein kationisches Polymer, das die negative Ladung der DNA abschirmt und so bewirkt, dass die DNA über Endozytose von der Zelle aufgenommen werden kann. Es wurde das Protokoll von Schirrmann und Büssow verwendet (Schirrmann und Büssow K. 2010). Lineares PEI (25 kDa) wurde in Reinstwasser zu 1 mg/ml gelöst und mit Salzsäure neutralisiert. Für die Transfektion wurde 1 µg der Plasmid-DNA in 30 µl DMEM ohne FBS oder Antibiotika verdünnt. In einem zweiten Ansatz wurden 30 µl DMEM mit 4 µl PEI-Lösung versetzt. Bei mehreren Plasmiden wurde auch die PEI-Menge angepasst. Nach dem Vermischen dieser beiden Ansätze wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und das Gemisch anschließend auf die Zellen getropft. Für größere Ansätze wurden die Mengen entsprechend erhöht.

Lipofectamin<sup>®</sup> LTX ist ein liposomales Transfektionsreagenz, das mit der DNA komplexiert, sodass sie von der Zelle aufgenommen werden kann. Bei der Transfektion mit Lipofectamin<sup>®</sup> LTX wurde den Empfehlungen des Herstellers folgend 0,5 µg DNA in DMEM ohne Zusätze verdünnt und mit 0,5 µl Plus Reagenz vermischt. Nach einer ersten Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur konnten 1,5 µl Lipofectamin<sup>®</sup> LTX dazu gegeben werden. Die Mengen von Plus Reagenz und Lipofectamin<sup>®</sup> LTX wurden bei 2 Plasmiden verdoppelt. Bei der zweiten Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur bildete sich der Transfektionskomplex, der auf die Zellen gegeben werden konnte. Die Weiterverarbeitung oder Analyse der Zellen erfolgte nach 36-48 Stunden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank.

#### 3.3.3 *Knockdown endogener Proteine in HEK293-Zellen mithilfe von siRNA*

siRNA steht für small interfering RNA und bezeichnet kleine RNA-Fragmente, die sich mit komplementären einzelsträngigen RNA-Molekülen verbinden und so deren Abbau provozie-

ren. Die Translation wird unterbunden und das entsprechende Protein nicht gebildet. Dieser Vorgang wird RNA-Interferenz genannt und ist ein natürlicher Mechanismus eukaryotischer Zellen, der eine gezielte Abschaltung von Genen ermöglicht. Zum ersten Mal auf diesen Effekt aufmerksam gemacht haben Napoli et al. (1990) sowie van der Krol et al. (1990). Sie brachten das Gen für die Chalkon-Synthase, welche für die Pigmentierung von Petunien mitverantwortlich ist, künstlich in die Pflanzenzellen ein. Dadurch wollten sie die Blütenfarbe intensivieren, doch stattdessen wurden die nachfolgenden Pflanzen-Generationen scheckig oder sogar weiß. Das eingeführte Gen und das homologe endogene Gen haben sich gegenseitig unterdrückt. Heutzutage ist die Verwendung von siRNA ein beliebtes Werkzeug in der Molekularbiologie, um die Expression einzelner Gene zu unterdrücken und so die Bedeutung der Proteine, für die sie kodieren, abzuleiten.

Um das fragliche Gen in HEK293-Zellen effektiv zu unterdrücken, wurden zwei unterschiedliche siRNAs pro Zielgen eingesetzt. Es wurden siRNAs der Produktreihe Silencer Select<sup>®</sup> (Fischer Scientific) verwendet, deren chemische Modifikation Genunterdrückung und Selektivität erhöhen sollen. Mit diesen siRNAs wurde eine reverse Transfektion durchgeführt. Das bedeutet, dass der Komplex aus Transfektionsreagenz und siRNA vorgelegt wurde und in einem zweiten Schritt mit der Zellsuspension vermischt wurde. Jeweils 75 pmol siRNA wurden in einem 35mm-Dish ( $\mu$ -Dish, ibiTreat, Ibbi, München) mit 500  $\mu$ l Opti-MEM<sup>®</sup> Medium verdünnt. Anschließend wurden 5  $\mu$ l Lipofectamin RNAiMAX<sup>®</sup> zupipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden HEK293-Zellen passagiert und in antibiotikafreies Medium (mit FBS) überführt. Die Zelldichte wurde auf 233 Zellen/ml eingestellt, sodass sich durch die Zugabe von 1500  $\mu$ l Zellsuspension zu jedem siRNA-Ansatz eine Zelldichte von 350000 Zellen/Dish ergab. 24 Stunden nach der reversen Transfektion mit siRNA wurden die HEK293-Zellen mit der cDNA für das Fusionskonstrukt  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  transfiziert. Dafür wurden das Transfektionsreagenz Lipofectamin<sup>®</sup> LTX und das unter 3.3.2 beschriebene Standardprotokoll verwendet. 48 Stunden nach dieser zweiten Transfektion wurden die Zellen mit dem CLSM analysiert. Direkt danach wurden die Cytosole oder Membranen der zuvor betrachteten HEK293-Zellen gewonnen und über SDS-Page und Westernblot untersucht. Als Negativkontrolle wurden zwei Silencer Select siRNAs eingesetzt, die mit einer Nonsensesequenz für kein bekanntes Gen kodieren.

### 3.3.4 Cytosol- und Membrangewinnung aus HEK293-Zellen

Bei der Cytosol- und Membrangewinnung aus HEK293-Zellen wurden unterschiedliche Puffer verwendet, je nach Verwendungszweck des rekombinanten Proteins. Zellen, deren Proteine für Immunopräzipitationen verwendet werden sollten, wurden in IP-Lysispuffer

weiterverarbeitet. Folgte nach der Cytosolgewinnung ausschließlich die Analyse über SDS-Page und Westernblot, wurde TEA-Lysispuffer verwendet. Zunächst wurde das Medium von den adhärent wachsenden Zellen abgesaugt. Anschließend wurde Puffer auf die Zellen gegeben und diese wurden mit einem Zellschaber vom Boden des Dishes oder der Vertiefung gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dafür wurde ein Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070 verwendet. Die Suspension wurde gekühlt und mit insgesamt 12 Zyklen à 16 s bei 50 %iger Intensität geschallt. Anschließend wurden die Zellen bei 21.000 \*g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde als Cytosol verwendet. Um die Membranfraktion zu erhalten, etwa beim Nachweis von Nectin-1, waren mehrere Zentrifugationsschritte nötig. Ein niedertouriger Zentrifugationsschritt mit 2800 \*g für 10 Minuten pelletierte grobe Zellfragmente, Zellorganellen und die Zellkerne. Dieses Pellet wurde verworfen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 21.000 \*g trennte die Membranfraktion im Pellet von dem Cytosol im Überstand. Das Pellet wurde in dem entsprechenden Puffer resuspendiert und durch Zugabe von Triton-X 100 solubilisiert. Mit einer 20 % igen Triton-X 100 Stammlösung wurde auf eine Endkonzentration von 2 % eingestellt. Die Suspension wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und alle 10 Minuten gevortext. Nach einer letzten Zentrifugation bei 21.000 \*g für 30 Minuten waren die solubilisierten Membranproteine im Überstand enthalten und konnten analysiert werden.

#### 3.3.5 Gewinnung von Cytosol und grobem Synaptosom aus Maushirn

Für die Präparation des groben Synaptosoms wurde sich an den Methoden von Cohen et al. und Mayer et al. orientiert (Cohen et al. 1977; Mayer et al. 1992). Die Mäusehirne wurden auf Eis aufgetaut, gewogen und in der ca. 10 fachen Menge Sucrose-Puffer mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflon Pistill mit 10 Hüben homogenisiert. Durch eine Zentrifugation bei 750 \*g für 10 Minuten wurden Gewebereste und Zellorganellen abgetrennt. Der Überstand wurde erneut für 10 Minuten zentrifugiert, dieses Mal bei 15.000 \*g. Dieser zweite Überstand wurde als cytosolische Fraktion weiterverwendet. Das das Synaptosom enthaltende Pellet wurde in Sucrosepuffer resuspendiert und mit Triton-X 100 zu einer Endkonzentration von 0,5 % versetzt. Für 10 Minuten wurde die Suspension auf Eis inkubiert und zwischendurch gevortext. Danach folgte die letzte Zentrifugation, für 20 Minuten bei 15.000 \*g. Dieser dritte Überstand wurde als synaptosomale Fraktion verwendet. Vor der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde auch den cytosolischen Fraktionen Triton-X 100 zugesetzt, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

### 3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Proteingehalt der Cytosole wurde nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford 1976). Bei dieser Bestimmung wird der Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250 verwendet. Proteine binden an diesen Farbstoff, der durch die Proteinbindung das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Anschließend wird die Absorption bei 595 nm gemessen.

Bei jeder Proteingehaltsbestimmung wurden Standards aus Rinderserumalbumin (BSA) mit vermessen. Sowohl mit den Standards als auch mit den Proben wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Cytosole wurden je nach erwarteter Konzentration 1:50 oder 1:100 mit PBS verdünnt. In eine 96-Lochplatte wurden dreimal 10 µl jedes Standards und jeder verdünnten Probe in die Vertiefungen vorgelegt und mit 190 µl Bradfordreagenz versetzt. Die Messung erfolgte im Sunrise<sup>TM</sup> Absorbance Reader, der anhand der BSA-Kalibrierung auch direkt die Proteinkonzentration der Probe berechnete.

Auch die Proteinkonzentration von Synaptosomen und Membranen wurden mit der Bradford Methode bestimmt, obwohl die Messung durch Triton X-100 verfälscht wird. Proteingehalt aus Proben mit Triton-X 100 wurden nur mit Proben verglichen, die die gleiche Menge Triton-X 100 enthielten.

### 3.3.7 Immunopräzipitation

Das ursprünglich aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammende Protein A hat die Eigenschaft, den Fc-Teil von Immunglobulinen zu binden. Dieses Merkmal macht man sich bei der Immunopräzipitation zu Nutze. In dieser Arbeit wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt, um dadurch Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei wird ein gegen das eine Protein gerichteter Antikörper über Protein A an Sepharosekügelchen gebunden. Über diese Brücke werden nicht nur die Proteine aus dem Cytosol gefischt, gegen die der Antikörper gerichtet ist, sondern auch Interaktionspartner dieses Proteins.

Immunopräzipitationen wurden sowohl mit überexprimierten Proteinen aus HEK293-Zellen als auch mit cytosolischer Fraktion und synaptosomaler Fraktion aus Mäusehirn durchgeführt. Von HEK293-Cytosolen wurden 1,5 mg Gesamtprotein mit 5 µg Antikörper versetzt und bei 4 °C zwei Stunden über Kopf geschüttelt. In dieser Zeit konnte sich ein Komplex aus Antikörpern und Antigenen bilden. Danach wurden zur Fällung des Immunkomplexes 20 mg zuvor in Milchpulver und BSA geblockte Protein A Sepharose Beads CL-B4 zugegeben und wieder 2 Stunden bei 4°C über Kopf schüttelnd inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Überstand bei 300 \*g abzentrifugiert und viermal mit IP-Lysispuffer gewaschen. Danach

wurden die an den Kügelchen bindenden Proteine durch Zugabe von IP-Probenpuffer und dreiminütiges Kochen dissoziiert. Der nun die Proteine enthaltende IP-Probenpuffer wurde abzentrifugiert, mit Bromphenolblau versetzt und über SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

Für die Immunopräzipitationen mit endogenen Proteinen wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll verwendet. Weil den Synaptosomen zugesetztes Triton-X 100 die Proteinbestimmung nach Bradford verfälscht, kann die eingesetzte Proteinmenge nur geschätzt werden. Um Gleichbehandlung von Cytosolproben und Synaptosomen zu gewährleisten, wurden den Cytosolen in entsprechenden Versuchen vor der Bradfordmessung die gleiche Menge Triton-X 100 zugesetzt wie den Synaptosomen. Eingesetzt wurden dann 4 mg berechnetes Gesamtprotein, wobei der tatsächliche Proteingehalt geringer war. Bei Immunopräzipitationen mit endogenem Protein wurde vor der Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes eine fünfstündige Vorklärung mit 20 mg Protein A Sepharose Beads CL-B4 durchgeführt. Die Inkubation mit Antikörpern der vorgeklärten Cytosole und Synaptosomen erfolgte über Nacht bei 4°C über Kopf schüttelnd. Präzipitiert, gewaschen und dissoziiert wurde wie bei den Versuchen mit überexprimierten Proteinen.

#### 3.3.8 SDS-PAGE und Western Blot

SDS-PAGE ist ein Standardverfahren der Proteinbiochemie, das Proteine der Größe nach trennt. Dabei bildet SDS mit den Proteinen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe, die in der Gelelektrophorese durch ein Polyacrylamidgel unterschiedlich weit zum Plus-Pol wandern.

Eine SDS-Probe enthielt je nach Versuch 50-100 µg Protein. Die Proteine wurden mit IP-Probenpuffer versetzt und 3 Minuten bei 99 °C gekocht, um eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten. Danach wurden die Proben mit Bromphenolblau versetzt, um das Pipettieren in die Geltaschen zu erleichtern. Es wurde das diskontinuierliche Lämmli-System verwendet, bei dem das Gel aus einem Trenngel, das 10 % oder 15 % Acrylamid enthält, und einem Sammelgel mit 5 % Acrylamid besteht. Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN (Bio-Rad) eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer überschichtet, der frisch aus einem 10-fachen Konzentrat verdünnt wurde. Als Größenstandards wurden ein gefärbter Marker (Page Ruler™ Prestained Protein ladder, Thermo Fisher Scientific) und ein ungefärbter Marker (Page Ruler™ Unstained Protein ladder, Thermo Fisher Scientific) auf jedes Gel mitaufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100V für 2-5 Stunden.

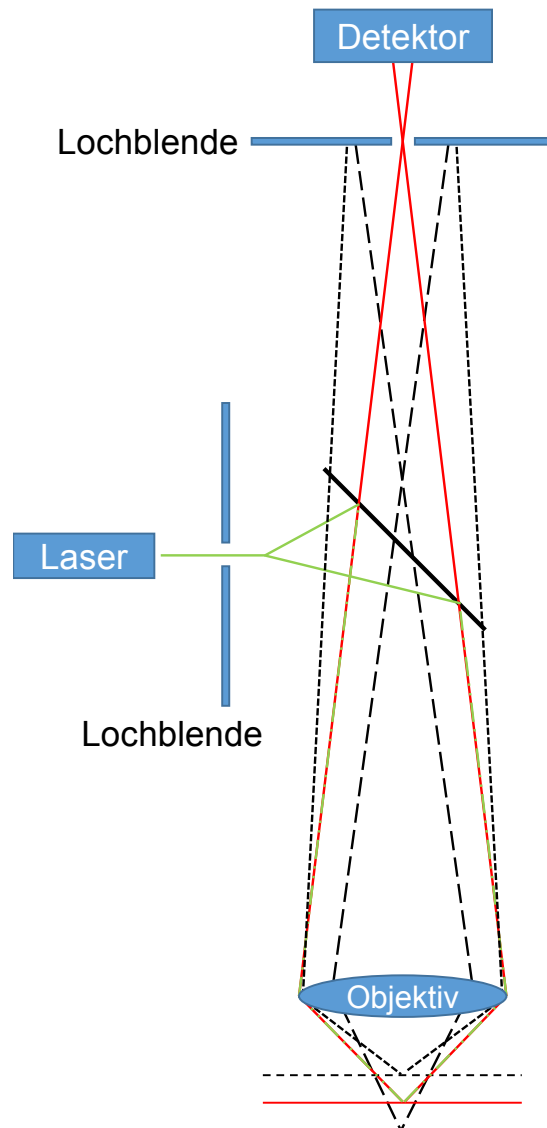


Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Bei diesem Verfahren, dem sogenannten Western Blot, wird das Gel auf die Membran gelegt und beides wird zwischen in Transferpuffer getränkten Filterpapieren in einem SemiDry Blotter platziert. Der angelegte Strom lässt die durch das SDS immer noch negativ geladenen Proteine zur Anode wandern, was in diesem Fall einer Übertragung vom Gel auf die Membran entspricht. Stromstärke und Dauer des Blottens richteten sich nach der Anzahl der gleichzeitig geblotteten Gele. Nach dem Blotten wurden die gleichmäßige Beladung der Gele und der Vorgang des Blottens durch eine Ponceau S Färbung kontrolliert. Der Farbstoff färbt alle Proteine reversibel an. So wurde auch der ungefärbte Marker auf der Membran sichtbar und konnte mit einem Kugelschreiber markiert werden. Nach einem zweiminütigen Bad in der Ponceau S Färbelösung wurden die Membranen mit Reinstwasser gewaschen, getrocknet und eingescannt. Um die Färbung wieder zu entfernen und unbesetzte Stellen auf den Membranen abzusättigen, wurden sie mindestens eine Stunde in einer 5%igen Milchpulverlösung in TBST geschwenkt. Danach erfolgte die Detektion mit entsprechenden Antikörpern. Die primären Antikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben oder laborinterner Erfahrung in TBST verdünnt, auf die Membranen gegeben und eine Stunde schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST wurde ein sekundärer Antikörper zu den Membranen gegeben, der gegen den  $F_c$ -Teil des primären Antikörpers gerichtet ist und mit einer Peroxidase des Meerrettichs fusioniert ist. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur und drei anschließenden Waschschritten mit TBST erfolgte die Detektion in der ECL Dokumentationsanlage Chemilux. Dabei setzt die HRP-Markierung (horseradish peroxidase) des sekundären Antikörpers das Luminol aus dem Detektionsreagenz Lumi-Light<sup>PLUS</sup> um und erzeugt so Licht, welches detektiert werden kann.

### 3.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) fährt ein über bewegliche Spiegel gelenkter Laserstrahl die Probe rasterförmig ab. Das emittierte Licht der fluoreszierenden Probe wird detektiert. Die einzelnen Pixel werden im Rechner durch Korrelation des mechanischen Rastervorganges mit den gemessenen Fluoreszenzintensitäten zu einem Bild oder sogar zu einem dreidimensionalen Modell zusammengesetzt. Entscheidend für die CLSM ist, dass Streulichtanteile von Bereichen außerhalb der Brennebene unterdrückt werden (siehe Abbildung 7). Das wird zum einen über die punktuelle Belichtung und zum anderen über eine spezielle Lochblende erreicht, die im Strahlengang des detektierten Lichtes sitzt und Streu-

licht aus anderen Ebenen blockiert. Es werden nur noch diejenigen Strukturen abgebildet, die sich unmittelbar in der Brennebene des Mikroskops befinden.



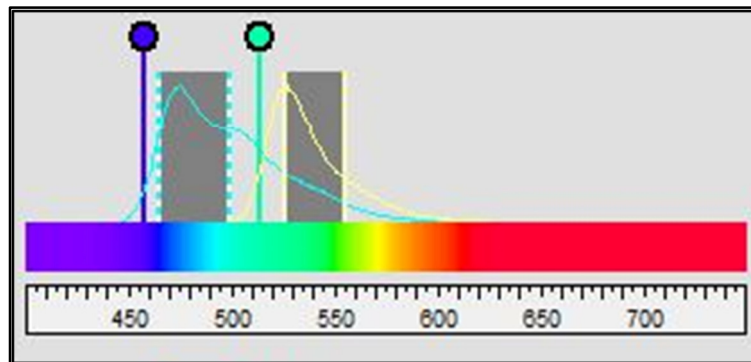
**Abbildung 7: Prinzip des konfokalen Mikroskops**

Bereiche außerhalb der Brennebene werden nicht abgebildet. Grün dargestellt ist das anregende Licht, rot das emittierte Licht aus der Brennebene, schwarz sind Streulichtanteile, die den Detektor nicht erreichen. Abgewandelt nach Engelhardt und Knebel (1993).

Das Fluoreszenzprotein GFP (grün fluoreszierendes Protein) fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün. Das Protein wurde 1961 von Shimomura et al. in der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* entdeckt (Shimomura et al. 1962) und hat sich zu einem wichtigen Werkzeug in der Zellbiologie entwickelt. Es wurde weiterentwickelt und verbessert, sodass heute eine Vielzahl von Fluoreszenzproteinen zur Verfügung steht, die sich in Anregungswellenlängen und Emissionsspektren unterscheiden. 2008 erhielten mehrere For-

scherguppen, die an der Entdeckung und Weiterentwicklung des GFPs beteiligt waren, dafür den Nobelpreis für Chemie (Shimomura 2009).

Für diese Arbeit wurden Fusionskonstrukte aus den entsprechenden Proteinen mit den Fluoreszenzproteinen *yellow fluorescent protein* (YFP) und *cyan fluorescent Protein* (CFP) untersucht. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskopsystem A1 und dem inversen Mikroskop Eclipse Ti von Nikon Instruments Europe (Amsterdam, Niederlande) aufgenommen. Die Analyse der Zellen erfolgte 48 Stunden nach Transfektion mit der entsprechenden cDNA bei 37° C mit einem 60-fachen Ölimmersionsobjektiv (CFI Plan Apo VC, numerische Apertur 1,4). Die Bilder wurden mit einem Vierkanal-Detektor aufgenommen. Dabei definieren Bandpass-Filter, die nur Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich durchlassen, welche Emission von dem Photomultiplier erfasst wird. Mit diesem Detektor ist es möglich, bis zu vier Fluorophore gleichzeitig und trotzdem getrennt voneinander zu vermessen, solange sich die Anregungs- und Emissionswellenlängen nicht überlappen. Zur Analyse des Fluoreszenzproteins CFP wurde mit einem Argonlaser bei 457 nm angeregt und bei der Detektion ein Bandpass-Filter 482/35 nm verwendet. Für das Fluoreszenzprotein YFP wurde mit einem Argonlaser bei 514 nm angeregt und das emittierte Licht über den Bandpass-Filter 540/30 nm analysiert. Die Größe des Scanbereiches betrug 512 x 512 Bildpunkte und die optische Schichtdicke lag zwischen 0,35 und 0,7 µm.



**Abbildung 8: Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine CFP und YFP**

Anregende Laser sind markiert durch senkrechte Striche, graue Kästen zeigen, in welchem Bereich Emission detektiert wird.

#### 3.4.1 Detektion der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation fluoreszierender Proteine

Um die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation eines fluoreszierenden Proteins zu quantifizieren, wurden pro Bedingung und Versuch mindestens drei Aufnahmen im Bereich einer möglichst konfluenten Zellschicht gemacht. Alle Zellen, die mindestens einen Zell-Zell-Kontakt zeigten, wurden gezählt und diese Anzahl durch die Anzahl aller fluoreszierenden Zellen geteilt. In

Experimenten mit zwei Konstrukten wurden nur Zellen bewertet, die sowohl YFP- als auch CFP-Signale der beiden entsprechend markierten Konstrukte zeigten.

#### 3.5 Statistische Auswertung

Alle Messdaten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Wurden mehrere Gruppen in einem Versuch miteinander verglichen, erfolgte zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse. Sollten im Anschluss Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen festgestellt werden, wurde nach Abschlusstest-Prinzip von Marcus, Peritz und Gabriel ein *studentscher* t-Test angeschlossen. Bei zwei Gruppen wurde direkt mit dem *studentschen* t-Test analysiert.

## 4 Ergebnisse

In HEK293-Zellen liegt das transient transfizierte Heterodimer aus den NOsGC-Untereinheiten  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert vor (Haase 2010; Busker 2013). Dabei unterliegt diese Lokalisation einer dynamischen Regulation (Busker 2013). Ein Regulationsmechanismus für die Steuerung der NOsGC an Zell-Zell-Kontakte könnte die Phosphorylierung des Enzyms sein. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Einflüsse dieser posttranslationalen Modifikation auf die subzelluläre Lokalisation in HEK293-Zellen untersucht.

### 4.1 Beeinflussung der subzellulären Lokalisation der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$ durch Phosphorylierung

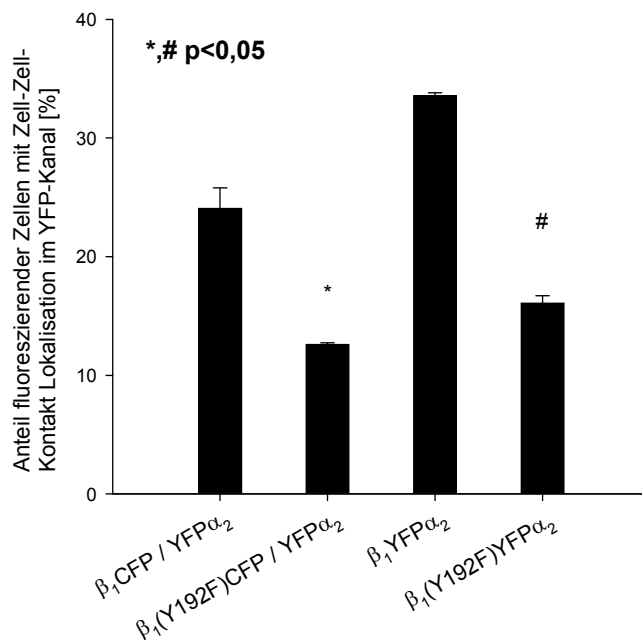
#### 4.1.1 Phosphorylierung des Tyrosins 192 in der $\beta_1$ -Untereinheit

Meurer et al. zeigten, dass die  $\beta_1$ -Untereinheit der NOsGC posttranslationalen Modifikationen unterliegt: Die  $\beta_1$ -Untereinheit kann an dem Tyrosin in Position 192 phosphoryliert werden (Meurer et al. 2005). Die Phosphorylierung führt zu einer Anlagerung der Src-like Kinase FYN an die  $\beta_1$ -Untereinheit. In Korbzellen des Kleinhirns wird die NOsGC durch FYN an die Plasmamembran gelenkt (Cioni et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung in Position 192 der  $\beta_1$ -Untereinheit eine Bedingung für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  ist. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die  $\beta_1$ -Untereinheit so verändert, dass eine Phosphorylierung an Position 192 verhindert wird. Dies wurde durch eine Mutagenese des Tyrosins 192 zum Phenylalanin erreicht. Im Vergleich zu Tyrosin fehlt dem Phenylalanin die Hydroxylgruppe am Phenylring der Aminosäure. Darum lässt sich Phenylalanin nicht phosphorylieren.

Der Einfluss der Mutation auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation wurde sowohl mit der Kombination aus den einzelnen Untereinheiten  $\beta_1$ CFP und YFP $\alpha_2$  als auch mit den Fusionskonstrukt  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  untersucht. Bei  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  sind die beiden Untereinheiten über das fluoreszierende Protein zu einer Proteinkette verbunden (Haase 2010). Da so die Heterodimerisierung erzwungen ist, ist die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation dieses Konstrukts deutlich besser zu erkennen als mit einzeln transfizierten Untereinheiten, bei denen ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Heterodimeren vorliegt.

Tatsächlich zeigte sich sowohl mit dem Fusionskonstrukt als auch mit den einzeln transfizierten Untereinheiten eine deutlich geringere Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation bei den nicht phosphorylierbaren Konstrukten ( $\beta_1$ (Y192F)YFP $\alpha_2$  und  $\beta_1$ (Y192F)CFP mit YFP $\alpha_2$ , Abbil-

dung 9). Das durch Koexpression gebildete Heterodimer aus  $\beta_1$ CFP und  $\text{YFP}\alpha_2$  lag in  $24,6 \pm 1,1$  % der Zellen an Zell-Zell-Kontakten. Wurde nicht der Wildtyp, sondern das nicht phosphorylierbare  $\beta_1(\text{Y192F})$ CFP mit  $\text{YFP}\alpha_2$  kotransfiziert, lag das Heterodimer nur noch in  $11,9 \pm 0,8$  % der Zellen an Zell-Zell-Kontakten. Die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation war also ungefähr auf die Hälfte reduziert. Auch bei dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  verringerte sich die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation auf die Hälfte: Das phosphorylierbare  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  war in  $33,7 \pm 0,1$  % der Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, das nicht phosphorylierbare  $\beta_1(\text{Y192F})\text{YFP}\alpha_2$  nur in  $15,3 \pm 0,4$  % der Zellen.



**Abbildung 9: Einfluss der Mutation Y192F in der  $\beta_1$ -Untereinheit der NOsGC auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der Isoform  $\alpha_2\beta_1$**

Ergebnisse aus vier unabhängigen Messungen mit jeweils drei Bildern. \* markiert signifikanten Unterschied zu  $\beta_1\text{CFP} / \text{YFP}\alpha_2$ , # markiert signifikanten Unterschied zu  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  in HEK293-Zellen abnimmt, wenn die Phosphorylierung der  $\beta_1$ -Untereinheit durch eine Punktmutation verhindert ist. Allerdings ist die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der mutierten Konstrukte nicht komplett verhindert. Eine Phosphorylierung in Position 192 der  $\beta_1$ -Untereinheit ist demnach keine notwendige Bedingung für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation, unterstützt diese aber. Des Weiteren ist auffällig, dass der Effekt der Mutation Y192F für beide Varianten,  $\beta_1$  und  $\alpha_2$  getrennt transfiziert oder fusioniertes  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ , vergleichbar ist. Würde eine Phosphorylierung der  $\beta_1$ -Untereinheit an Position 192 eine Heterodimerisierung fördern und so die

Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation unterstützen, fiel eine Mutation in dem erzwungenen Heterodimer  $\beta_1(Y192F)\alpha_2$  nicht ins Gewicht, weil das Konstrukt nach wie vor zu 100 % als Heterodimer vorliegen würde. Daraus, dass der Effekt der Mutation für die einzelnen NOsGC-Untereinheiten und für das erzwungene Heterodimer gleich ist, lässt sich folglich schließen, dass der Signalweg, über den eine Phosphorylierung des Tyrosins 192 in der  $\beta_1$ -Untereinheit die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation unterstützt, von der Heterodimerisierung unabhängig ist.

#### 4.1.2 Phosphorylierung am Carboxyterminus der $\alpha_2$ -Untereinheit

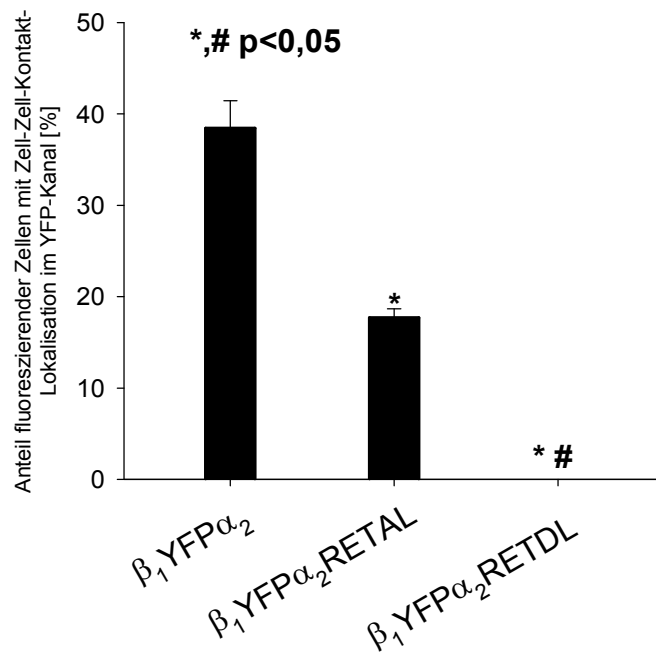
Die letzten sieben Aminosäuren der  $\alpha_2$ -Untereinheit, im Einbuchstabencode –FLRETSL, bilden eine Erkennungssequenz für die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II (CamKII) (White et al. 1998). Die CamKII könnte über die Phosphorylierung des Serins an Position 729 (Nummerierung Ratte) an der Regulation der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation beteiligt sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Phosphorylierung der  $\alpha_2$ -Untereinheit an dem Serin 729 einen Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$  hat. Die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation ist bei dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  häufiger als bei einzeln transfizierten Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\alpha_2$ . Deshalb wurde die Mutation des Serins 729 in dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  durchgeführt. Als phosphomimetische Aminosäure wurde Asparaginsäure gewählt ( $\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{RETDL}$ ). In einer zweiten Mutagenese wurde das Serin in Position 729 zu einem Alanin mutiert, um auch ein nicht phosphorylierbares Konstrukt mit dem Wildtyp vergleichen zu können ( $\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{RETAL}$ ).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Tatsächlich zeigte sich sowohl für die phosphomimetische wie auch für die nicht mehr phosphorylierbare Mutante ein deutlicher Effekt, nämlich eine Reduktion der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation. In dieser Versuchsreihe war der Wildtyp  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in  $38,4 \pm 3,0$  % der Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Die phosphomimetische Mutante  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{RETDL}$  war nicht mehr an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, was eine Unterstützung der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation durch Phosphorylierung des Serins in Position 729 unwahrscheinlich macht. Die Mutante  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{RETAL}$  war in  $17,7 \pm 1,85$  % der Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Dies stellt ebenfalls eine signifikante Reduktion dar.

Beide Mutationen am Carboxyterminus der  $\alpha_2$ -Untereinheit reduzierten die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp. Die Mutation, die eine Phosphorylierung durch die CamKII imitiert, führte allerdings überraschend zu einem kompletten Ausbleiben der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation. Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese, dass die CamKII das NOsGC Heterodimer  $\alpha_2\beta_1$  an Zell-Zell-Kontakte lenkt. Im Gegenteil könnte eine Phosphory-

lierung an Position 729 der  $\alpha_2$ -Untereinheit die NOsGC weg vom Zell-Zell-Kontakt hin zu einer anderen Zielstruktur lenken.



**Abbildung 10: Einfluss der Mutationen S729A und S729D in der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der Isoform  $\alpha_2\beta_1$**

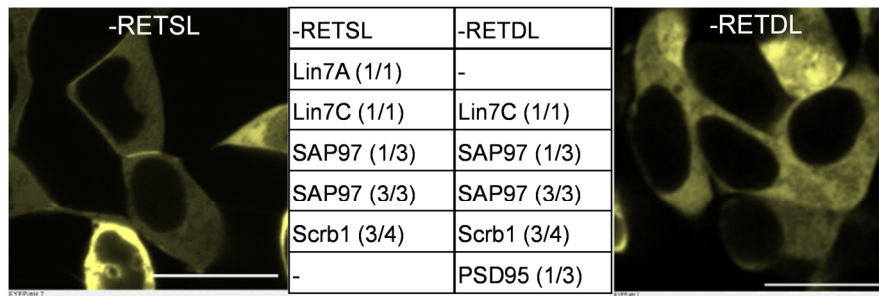
Ergebnisse aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei Bildern. \* markiert signifikanten Unterschied zu  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ , # markiert signifikanten Unterschied zu  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2\text{RETAL}$ .



## 4.2 Interaktion der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$ mit dem Adapterprotein Lin7a

Der Carboxyterminus der  $\alpha_2$ -Untereinheit bildet nicht nur eine Erkennungssequenz für die CamKII, sondern auch ein PDZ-Bindemotiv (Aminosäurerequenz: –RETSL), über das die Bindung an eine PDZ-Domäne möglich ist (vgl. Kapitel 1.3). In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe wurden über eine Affinitätschromatographie mit einem Peptid des PDZ-Bindemotivs der NOsGC  $\alpha_2$ -Untereinheit mögliche Interaktionspartner identifiziert (Hochheiser et al. 2016). Neben den bereits bekannten Interaktionspartnern PSD-93 und PSD-95 (Russwurm et al. 2001) und dem Polaritätsprotein Scribble (Ivarsson et al. 2014) wurden die PDZ-Domänen enthaltenden Proteine Lin7a und MPP3 (MPP für *membrane palmitoylated protein*) über Massenspektrometrie identifiziert. MPP3 besitzt eine PDZ-Domäne vom Typ 2, was der Typ 1-Erkennungssequenz der  $\alpha_2$ -Untereinheit nicht entspricht. Lin7a weist eine PDZ-Domäne vom Typ 1 auf.

Stiffler et al. (2007) untersuchten über Protein Microarray und quantitative Fluoreszenz-Polarisation 157 PDZ-Domänen und 217 PDZ-Bindemotive des Maus-Proteoms. Aus den Ergebnissen entwickelten sie ein Modell, das in der Lage ist, Interaktionen zwischen PDZ-Domänen und PDZ-Bindemotiven vorherzusagen. Von den PDZ-Domänen, die die PDZ-Erkennungssequenz der  $\alpha_2$ -Untereinheit mit den Aminosäuren –RETSL erkennen, zeigen fast alle auch eine Affinität zu der Sequenz –RETDL des  $K^+$ -Kanals Kcna5 (Abbildung 11). Die PDZ-Domäne, die das Heterodimer  $\beta_1\alpha_2$  an Zell-Zell-Kontakte dirigiert, interagiert spezifisch mit der Erkennungssequenz –RETSL, nicht aber mit der Sequenz –RETDL (vgl. Abbildung 10). Wir schlussfolgerten, dass diese Spezifität ein Alleinstellungsmerkmal für den gesuchten Interaktionspartner der  $\alpha_2$ -Untereinheit sein könnte, und durchsuchten die Daten von Stiffler nach Proteinen, die nicht mit –RETDL, wohl aber mit –RETSL interagieren. Im Gegensatz zu den PDZ-Domänen von SAP97 und -102,  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Syntrophin und Lin7c weist die PDZ-Domäne von Lin7a nur eine Affinität zu der Erkennungssequenz der NOsGC  $\alpha_2$ -Untereinheit auf.



**Abbildung 11: Vorhergesagte Interaktionspartner der PDZ-Bindemotive -RETSL und -RETDL und Lokalisation der entsprechenden Konstrukte in HEK293 Zellen**

Mittlere Spalte: Proteine mit PDZ-Domänen, die nach den Ergebnissen von Stiffler et al. mit den PDZ-Bindemotiven RETSL oder RETDL interagieren. Die Nummer der entsprechenden Domäne sowie die Gesamtzahl der im Protein enthaltenen PDZ-Domänen sind jeweils in Klammern angegeben. Äußere Spalten: Mikroskopische Aufnahme der Fusionskonstrukte  $\beta_1YFP\alpha_2$  (links) und  $\beta_1YFP\alpha_2RETDL$  (rechts) transient in HEK293-Zellen transfiziert. Die Balken entsprechen 20  $\mu m$ .

Sowohl die Ergebnisse der Affinitätschromatographie mit dem PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit als auch die beschriebene Selektivität für das Bindemotiv -RETSL machen Lin7a als möglichen direkten Interaktionspartner der NOsGC  $\alpha_2$ -Untereinheit für weitere Untersuchungen besonders interessant.

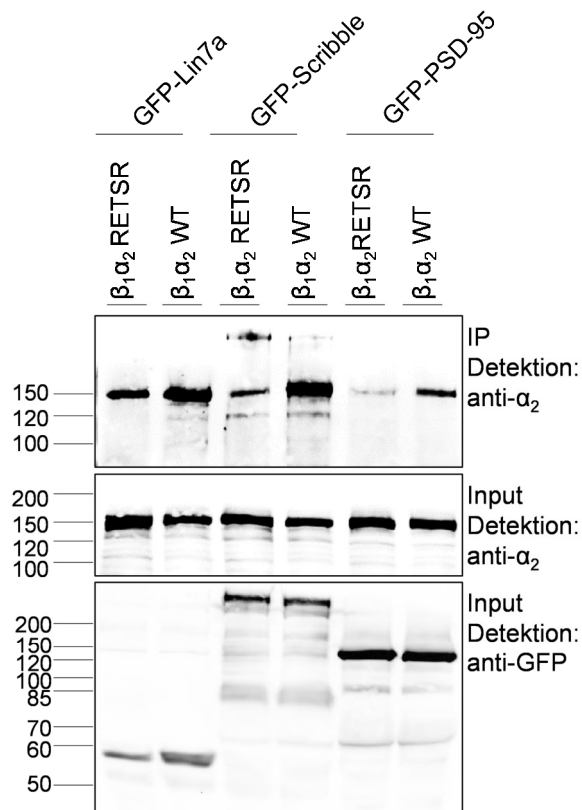
#### 4.2.1 Immunopräzipitation von NOsGC-Fusionskonstrukten mit GFP-Lin7a, GFP-Scribble und GFP-PSD-95

Mittels Immunopräzipitation sollte überprüft werden, ob das Fusionsprotein aus den NOsGC-Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\alpha_2$  über die PDZ-Erkennungssequenz -RETSL mit den PDZ-Domänen-Proteinen PSD-95, Scribble und Lin7a interagiert. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Interaktion zwischen der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  und den Proteinen Scribble und PSD-95 (Russwurm et al. 2001; Ivarsson et al. 2014) erwarteten wir, diese Interaktionen ebenfalls nachweisen zu können. Wegen der oben beschriebenen Hinweise auf eine Interaktion zwischen  $\alpha_2\beta_1$  und Lin7a erwarteten wir auch für dieses Proteinpaar eine Interaktion. Fluoreszenzproteinemarkierte Konstrukte der potenziellen Interaktionspartner wurden zusammen mit dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$  transient in HEK293-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle verwendeten wir eine Mutante von dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$ , bei der die carboxyterminale hydrophobe Aminosäure Leucin (L) durch die basische Aminosäure Arginin (R) ersetzt ist. Dadurch entsteht bei dem mutierten Konstrukt die PDZ-Erkennungssequenz -RETSR. Bei dem Fusionskonstrukt  $\beta_1YFP\alpha_2$  führt diese Mutation dazu, dass das Konstrukt nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen und Analyse im CLSM nicht mehr an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist (Haase 2010). Wir erwarteten deshalb, dass dieses mutierte Fusionsprotein

$\beta_1\alpha_2$ RETSR nicht mit den PDZ-Domänen-Proteinen interagiert. Nach Präzipitation mit einem gegen das Fluoreszenzprotein gerichteten Antikörper wurde das Eluat mittels Westernblott analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Im oberen Blot sind in den Reihen 2, 4 und 6 deutlich Banden zu erkennen.  $\beta_1\alpha_2$  ließ sich also wie erwartet mit den drei PDZ-Proteinen Lin7a, PSD-95 und Scribble präzipitieren. Die Banden von mit Lin7a und mit Scribble präzipitiertem  $\beta_1\alpha_2$  sind in etwa gleich stark. Die Bande von mit PSD-95 präzipitiertem  $\beta_1\alpha_2$  ist deutlich schwächer. Zu unserer Überraschung war auch das mutierte Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$ RETSR in den Präzipitaten von Lin7a, Scribble und PSD-95 nachweisbar (oberer Blot, Reihen 1,3 und 5). Die Banden sind jeweils schwächer als die Banden von Wildtyp  $\beta_1\alpha_2$  mit dem entsprechenden PDZ-Protein, doch die Interaktion scheint durch die Mutation innerhalb der RETSL-Sequenz nicht vollständig unterbunden zu sein. Der mittlere und der untere Blot zeigen die Westernblotanalyse der für die Immunopräzipitation verwendeten Cytosole. Das Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$  (mittlerer Blot) wurde in allen Proben gleichmäßig exprimiert. Die fluoreszenzproteinmarkierten PDZ-Domänen-Proteine wurden unterschiedlich stark exprimiert. Die Banden von GFP-Lin7a in den ersten beiden Spalten sind wesentlich schwächer als die Banden von GFP-Scribble in den Spalten 3 und 4. GFP-PSD-95, aufgetragen in den Spalten 5 und 6, wurde von den drei Proteinen am stärksten exprimiert. Es ist auffällig, dass mit GFP-Lin7a genau so viel  $\beta_1\alpha_2$  präzipitiert wurde wie mit GFP-Scribble, obwohl GFP-Lin7a deutlich weniger exprimiert wurde. Zwischen GFP-Lin7a und GFP-PSD-95 ist der Unterschied noch größer: Obwohl GFP-PSD-95 deutlich stärker exprimiert wurde als GFP-Lin7a, lässt sich im Präzipitat von GFP-PSD-95 weniger  $\beta_1\alpha_2$  nachweisen als im Präzipitat von Lin7a.

Zusammengenommen zeigt das Ergebnis dieser Immunopräzipitation, dass Lin7a, Scribble und PSD-95 mit  $\beta_1\alpha_2$  interagieren. Dabei ist die Interaktion mit Lin7a besonders stark. Die Mutation des carboxyterminalen Leucin zu Arginin im PDZ-Bindemotiv von  $\beta_1\alpha_2$  führt nicht dazu, dass die Interaktion zwischen  $\beta_1\alpha_2$  und den PDZ-Domänen-Proteinen komplett unterbunden wird.



**Abbildung 12: Assoziation von der NOSGC-Isoform  $\beta_1\alpha_2$  mit den fluoreszenzproteinmarkierten Proteinen Lin7a, Scribble und PSD-95**

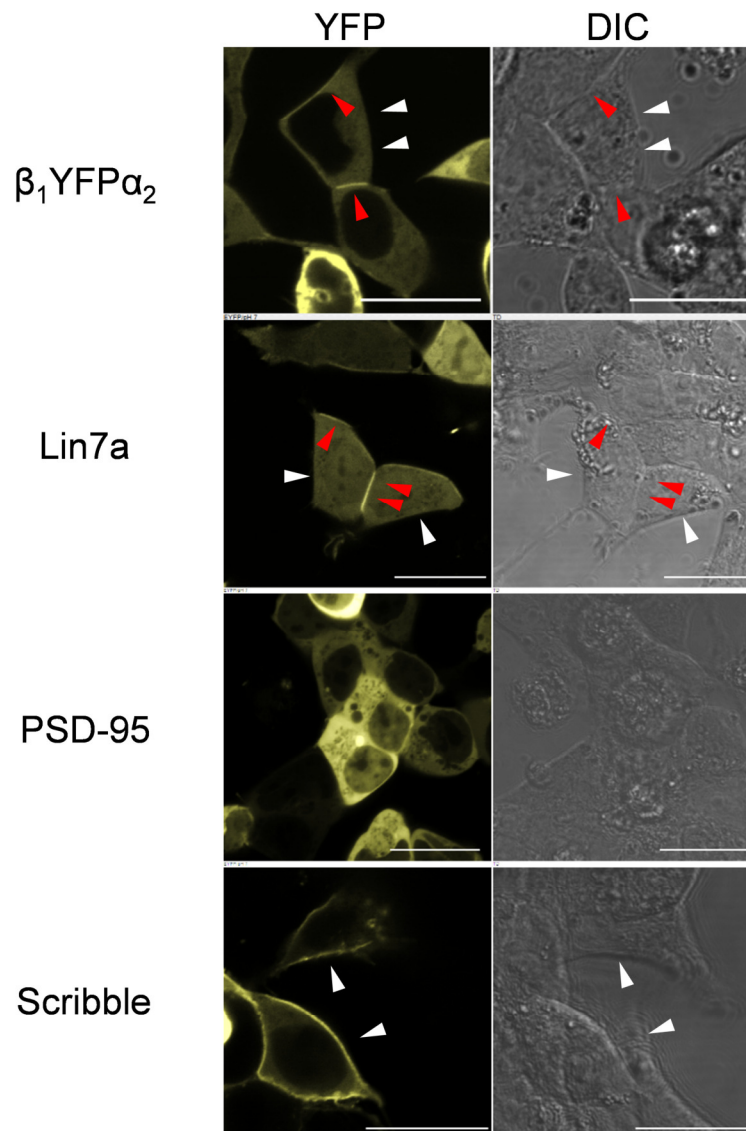
Westernblotanalyse der mit anti-XFP immunpräzipitierten Cytosole von transient transfizierten HEK293-Zellen. Die transfizierten Konstrukte sind über den Blots angegeben. Präzipitate wurden mit anti- $\alpha_2$  (EP073512) detektiert (oberer Blot). Die errechnete Größe des Fusionskonstruktes  $\beta_1\alpha_2$  liegt bei 163 kDa, damit entspricht die obere Bande der des Fusionskonstruktes. Inputs wurden mit anti- $\alpha_2$  (mittlerer Blot) und anti-XFP (unterer Blot) detektiert. Der Versuch wurde einmal von Ines Glöckner durchgeführt.

#### 4.2.2 Lokalisation von Lin7a an Zell-Zell-Kontakten

Es ist wahrscheinlich, dass der direkte Interaktionspartner des Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$ , über den die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation dieser NOSGC-Isoform vermittelt wird, eine vergleichbare Lokalisation zeigt. Um die Lokalisation der Proteine Lin7a, PSD-95 und Scribble mit der Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  vergleichen zu können, wurden diese PDZ-Domänen enthaltenden Proteine mit Fluoreszenzproteinen fusioniert und in HEK293-Zellen untersucht.

Wie erwartet war das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Abbildung 13): In der obersten Reihe von Abbildung 13 ist die stärkere Fluoreszenz von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an der Membran zwischen zwei Zellen deutlich zu erkennen (rote Pfeile). Weiße Pfeile markieren Membranabschnitte ohne Nachbarzellen. An diesen ist keine erhöhte Fluoreszenz sichtbar. Tatsächlich zeigte YFP-Lin7a eine dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ähnliche subzelluläre Lokalisation (Abbildung 13, zweite Reihe): Die Lokalisation des fluoreszenzmarkierten Proteins am Zell-Zell-Kontakt ist mit dem roten Pfeil markiert. Wie bei  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zeigen Membranabschnitte ohne Nachbarzelle auch bei YFP-Lin7a exprimierenden HEK293-Zellen keine erhöhte Fluoreszenz (weiße Pfeile). Im Gegensatz dazu ist die subzelluläre Lokalisation von PSD-95 und Scribble deutlich anders als die Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ . PSD-95 zeigt eine cytosolische Verteilung (Abbildung 13, dritte Reihe). Das Polaritätsprotein Scribble

liegt unabhängig von Zell-Zell-Kontakten an der Zellmembran. Die weißen Pfeile in der letzten Reihe von Abbildung 13 deuten auf Stellen, an denen eine Membranlokalisation von Scribble zu erkennen ist, obwohl das Durchsichtsbild zeigt, dass keine benachbarte Zelle vorhanden ist. Folglich ist Lin7a der einzige potenzielle Interaktionspartner von  $\alpha_2\beta_1$ , der in HEK293-Zellen eine vergleichbare zelluläre Verteilung zeigt.



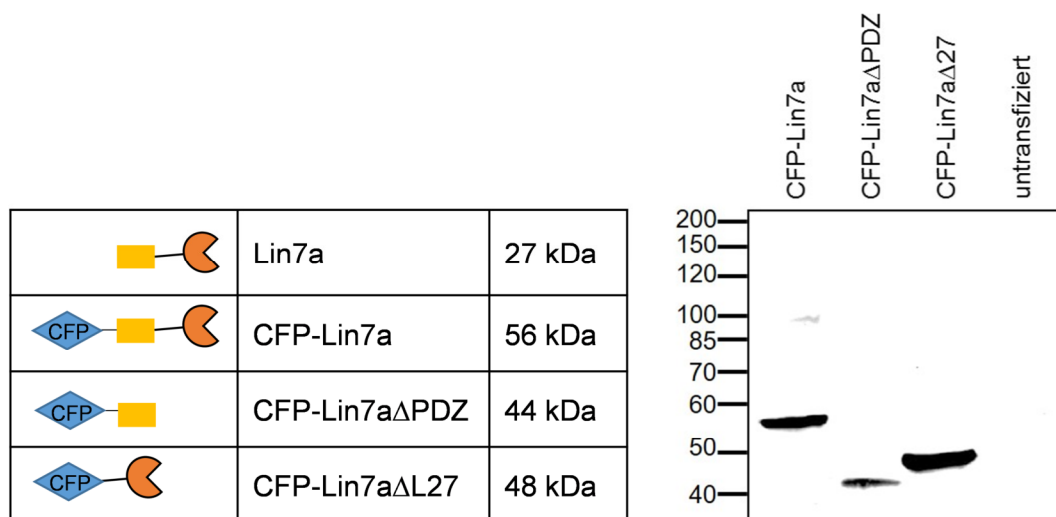
**Abbildung 13: Lokalisation von Fusionskonstrukt  $\beta_1YFP\alpha_2$  und fluoreszenzmarkierten Proteinen Lin7a, PSD-95 und Scribble in HEK293-Zellen**

Rote Pfeile zeigen auf Membranabschnitte, die erhöhte Fluoreszenz zeigen und sich an Kontakten zwischen zwei Zellen befinden. Weiße Pfeile zeigen auf Membranabschnitte ohne Nachbarzellen. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme. Der Balken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . PSD-95 und Scribble wurden mit den Konstrukten und nach dem Vorbild von Haase (04.08.2010) und Busker (30.10.2013) transfiziert.

#### 4.2.3 Dominant negativer Effekt von *Lin7a* $\Delta$ PDZ und *Lin7a* $\Delta$ L27 auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von $\beta_1$ YFP $\alpha_2$

Das kleine Adapterprotein Lin7a besteht aus einer L27- und einer PDZ-Domäne Typ 1. Es sollte untersucht werden, ob die Kotretransfektion von Lin7a einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Fusionskonstruktes  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  hat.

Neben vollständigem fluoreszenzmarkierten Lin7a wurden auch Fusionskonstrukte von Lin7a untersucht, die aus dem Fluoreszenzprotein und nur einer der beiden Domänen von Lin7a bestehen. In Abbildung 14 sind die verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt: Nicht markiertes Lin7a ist 27 kDa groß. Nach der Kopplung an ein ca. 30 kDa großes Fluoreszenzprotein ist die errechnete Größe des Fusionskonstruktes CFP-Lin7a 56 kDa. Das Fusionskonstrukt CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ besteht ausschließlich aus der amino-terminal markierten L27-Domäne von Lin7a und ist 44 kDa groß. Komplementär wurde auch die einzelne PDZ-Domäne mit dem Fluoreszenzprotein CFP fusioniert: CFP-Lin7a $\Delta$ L27 hat eine Größe von 48 kDa. Die Expression der fluoreszenzmarkierten Lin7a-Konstrukte in HEK-293 Zellen wurde nach elektrophoretischer Auftrennung mit spezifischem Antikörper gegen das Fluoreszenzprotein überprüft (Abbildung 14). Die Analyse zeigte, dass die fluoreszenzmarkierten Lin7a-Konstrukte das erwartete Molekulargewicht aufweisen und in HEK293-Zellen exprimiert werden.



**Abbildung 14: Expression und Größe fluoreszenzmarkierter Lin7a-Konstrukte.**

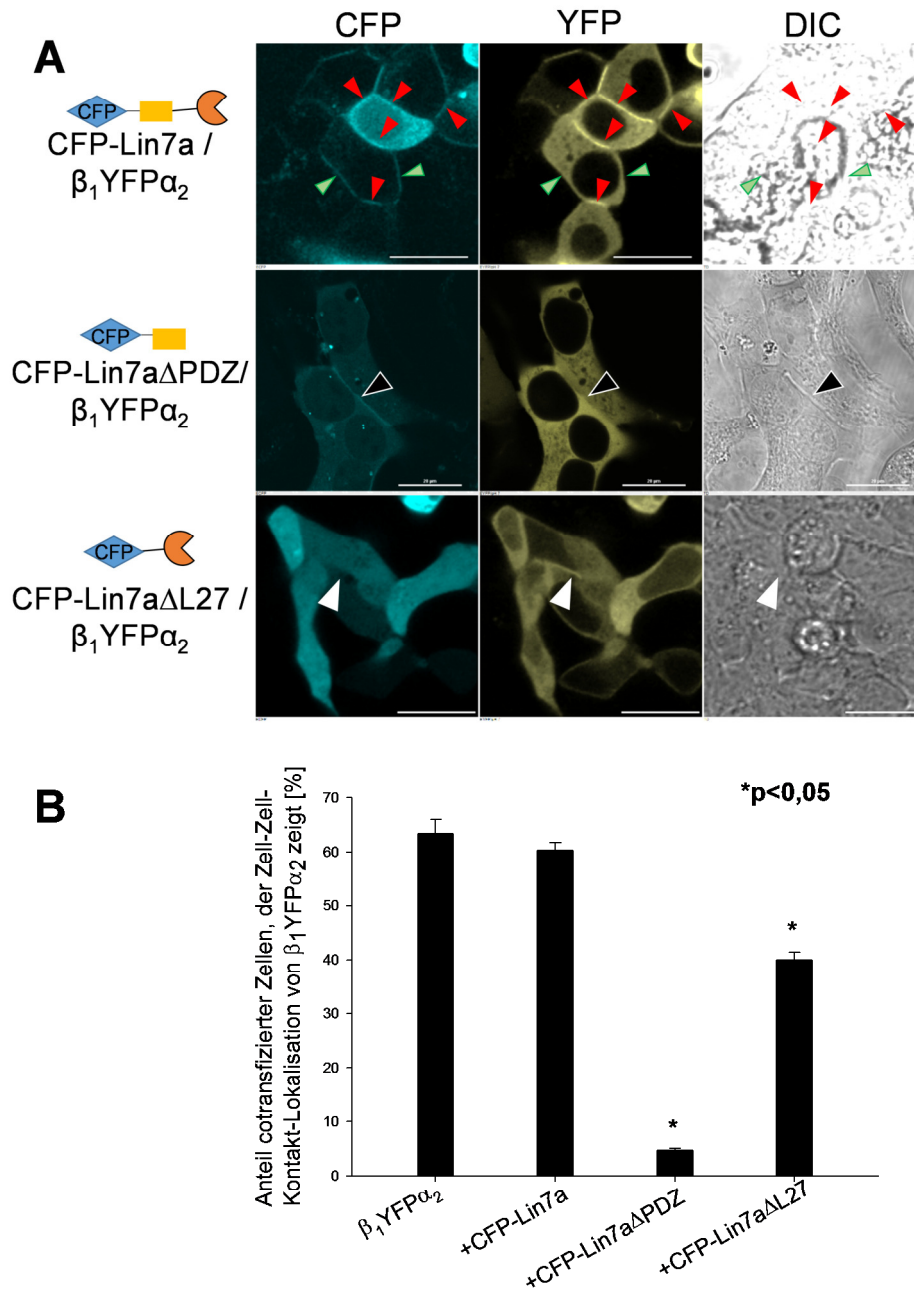
Links: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Lin7a-Konstrukte mit errechneter Größe der Proteine. Rechts: Cytosolische Fraktion aus zuvor mit den entsprechenden Konstrukten transient transfizierten HEK293-Zellen. Aufgetragen wurden 80 mg Gesamtprotein, detektiert wurde mit anti XFP-Antikörper.

Um den Einfluss von Lin7a auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zu untersuchen, wurden die verschiedenen Lin7a-Konstrukte mit  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in HEK293-Zellen kotransfiziert. Die mikroskopische Untersuchung von mit  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  kotransfiziertem CFP-Lin7a zeigt, dass CFP-Lin7a und  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  beide an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert sind und teilweise koloalisieren (Abbildung 15 A, erste Reihe, rote Pfeile). An einigen Zell-Zell-Kontakten hingegen ist ausschließlich CFP-Lin7a membranär lokalisiert,  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  allerdings nicht (grüne Pfeile). Lin7a $\Delta$ PDZ besteht aus der einzelnen L27-Domäne und ist genau wie vollständiges Lin7a an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Abbildung 15, zweite Reihe, schwarze Pfeile). Dieselben Zellen zeigen keine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ . Lin7a $\Delta$ L27, die einzelne PDZ-Domäne, liegt homogen in der Zelle verteilt, also nicht am Zell-Zell-Kontakt lokalisiert vor (Abbildung 13, dritte Reihe). Die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von Lin7a in HEK293-Zellen ist folglich abhängig von dem Vorhandensein einer intakten L27-Domäne. Die Aufnahme von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  mit kotransfiziertem Lin7a $\Delta$ L27 zeigt eine schwache Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  (weißer Pfeil).

Die quantitative Auswertung der Versuche zeigt einen deutlichen Effekt der Deletionsmutanten CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ und CFP-Lin7a $\Delta$ L27 auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  (Abbildung 15 B): Ohne Kotransfektion von Lin7a-Konstrukten waren in dieser Versuchsreihe in  $63,4 \pm 2,6$  % der  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  exprimierenden Zellen stark fluoreszierende Zell-Zell-Kontakte zu beobachten. Kotransfiziertes CFP-Lin7a änderte den Anteil an Zellen mit Zell-Zell-Kontakt Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  nicht signifikant ( $60,3 \pm 1,5$  %). Doch beide Deletionsmutanten verdrängten  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  von den Zell-Zell-Kontakten. Dabei war der Effekt bei CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ besonders ausgeprägt.  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  war nur noch in  $4,7 \pm 0,4$  % der kotransfizierten Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. CFP-Lin7a $\Delta$ L27 reduzierte die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisierung von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  auf  $40 \pm 1,4$  %.

Die dargestellten Ergebnisse unterstützen die These, dass die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  von Lin7a vermittelt ist. Sowohl die einzelne PDZ-Domäne als auch die einzelne L27-Domäne wirken dominant negativ auf die Lokalisation des Fusionskonstruktes  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  am Zell-Zell-Kontakt.





**Abbildung 15: Einfluss unterschiedlicher Lin7a-Konstrukte auf die Lokalisation von  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$**

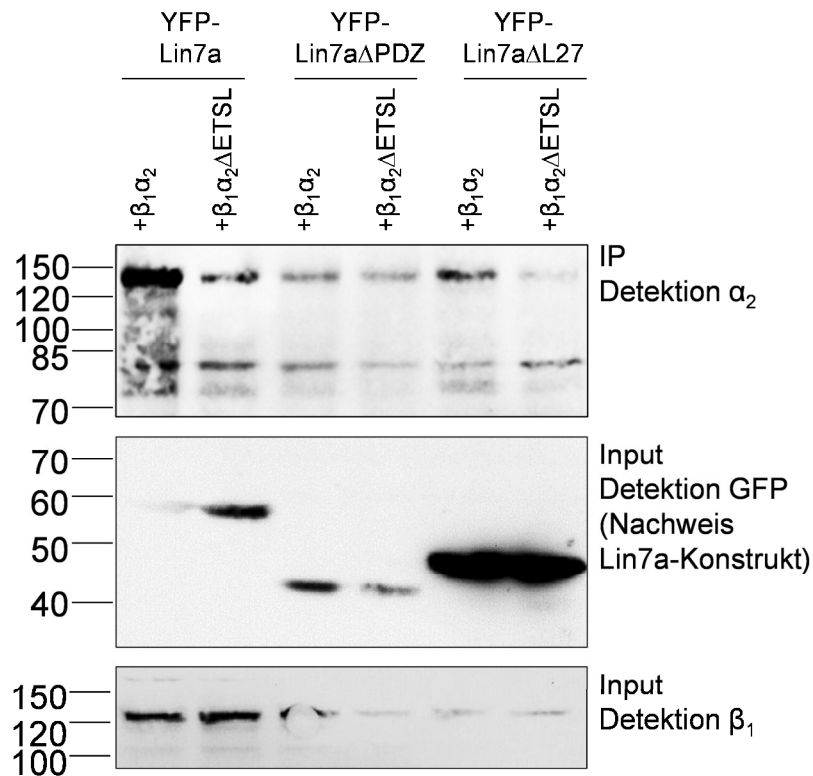
A: Mikroskopische Analyse der Konstrukte CFP-Lin7a, CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ und CFP-Lin7a $\Delta$ L27 kotransfiziert mit  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  in HEK293-Zellen. Rote Pfeile kennzeichnen Koloalokalisation von CFP-Lin7a und  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ , grüne Pfeile zeigen auf Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von CFP-Lin7a ohne  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ , der schwarze Pfeil zeigt auf Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ.  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  ist nicht an Zell-Zell-Kontakten mit CFP-Lin7a $\Delta$ PDZ lokalisiert. CFP-Lin7a $\Delta$ L27 ist nicht an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, während kotransfiziertes  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  weiterhin am Zell-Zell-Kontakt lokalisiert ist (weißer Pfeil). B Anteil von Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten im YFP-Kanal von allen transient kotransfizierten Zellen in Prozent. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei ausgewerteten Bildern. \*markiert signifikante Unterschiede gegenüber allein transfiziertem  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ .



#### 4.2.4 Immunopräzipitation von NOsGC-Fusionskonstrukten mit fluoreszenzmarkierten Lin7a-Konstrukten

Die oben beschriebene dominant negative Wirkung der Deletionsmutanten von Lin7a auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  spricht für eine direkte Interaktion zwischen der PDZ-Domäne von Lin7a und der PDZ-Erkennungssequenz der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$ . Auch die Ergebnisse der vergleichenden Immunopräzipitation von  $\alpha_2\beta_1$  mit PSD-95, Scribble und Lin7a sprechen für eine Interaktion zwischen der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  und Lin7a. Um zu überprüfen, ob  $\alpha_2\beta_1$  tatsächlich über die carboxyterminale PDZ-Erkennungssequenz mit der PDZ-Domäne von Lin7a interagiert, wurde eine Immunopräzipitation mit den verschiedenen Lin7a-Konstrukten durchgeführt (YFP-Lin7a, YFP-Lin7a $\Delta$ PDZ, YFP-Lin7a $\Delta$ L27). Die zur Immunopräzipitation verwendeten HEK293-Zellen wurden mit einem Lin7a-Konstrukt und einem fluoreszenzproteinfreien Fusionskonstrukt der NOsGC-Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\alpha_2$  transfiziert. Dabei war der Carboxyterminus dieses Fusionskonstruktes  $\beta_1\alpha_2$  jeweils in einem Ansatz unversehrt und in einem zweiten Ansatz um die PDZ-Erkennungssequenz von  $\alpha_2$  deletiert. Wir erwarteten eine Interaktion zwischen vollständigem  $\beta_1\alpha_2$  und YFP-Lin7a sowie zwischen vollständigem  $\beta_1\alpha_2$  und Lin7a $\Delta$ L27, weil in diesen beiden Ansätzen sowohl PDZ-Domäne als auch PDZ-Erkennungssequenz für eine Bindung zur Verfügung stehen.

Abbildung 16 zeigt die Immunopräzipitation zwischen YFP-markierten Lin7a-Konstrukten und dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$  über einen gegen das Fluoreszenzprotein an Lin7a gerichteten Antikörper. Wie zu erwarten zeigte sich eine deutliche Interaktion zwischen YFP-Lin7a und dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$  mit intaktem PDZ-Bindemotiv (Abbildung 16, oberer Blot, erste Spalte). Wie vermutet ließ sich auch eine schwächere Interaktion zwischen  $\beta_1\alpha_2$  und YFP-Lin7a $\Delta$ L27 nachweisen (oberer Blot, fünfte Spalte). Überraschenderweise sind schwächere Banden auch bei YFP-Lin7a und  $\beta_1\alpha_2\Delta$ ETSL sowie bei beiden NOsGC-Varianten mit YFP-Lin7a $\Delta$ PDZ zu erkennen (oberer Blot, Spalten 2, 3 und 4). Einzig bei YFP-Lin7a $\Delta$ L27 mit  $\beta_1\alpha_2\Delta$ ETSL (oberer Blot, sechste Spalte) ist fast keine Bande zu erkennen. Die eingesetzten Cytosole sind auf den unteren beiden Blots dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Lin7a-Konstrukte, die im mittleren Blot über das Fluoreszenzprotein nachgewiesen wurden, unterschiedlich stark exprimiert wurden. In dem Ansatz mit YFP-Lin7a und  $\beta_1\alpha_2$  (mittlerer Blot, erste Spalte) ist YFP-Lin7a gar nicht nachweisbar. Hier liegt wahrscheinlich ein Fehler beim Westernblot vor, denn über das Fluoreszenzprotein wurde  $\beta_1\alpha_2$  deutlich kopräzipitiert (oberer Blot, erste Spalte). YFP-Lin7a muss also vorhanden gewesen sein. Auch das Fusionskonstrukt, nachgewiesen mit dem  $\beta_1$ -Antikörper, zeigt unterschiedlich starke Banden.



**Abbildung 16: Assoziation von NOsGC-Isoform  $\beta_1\alpha_2$  an YFP-Lin7a**

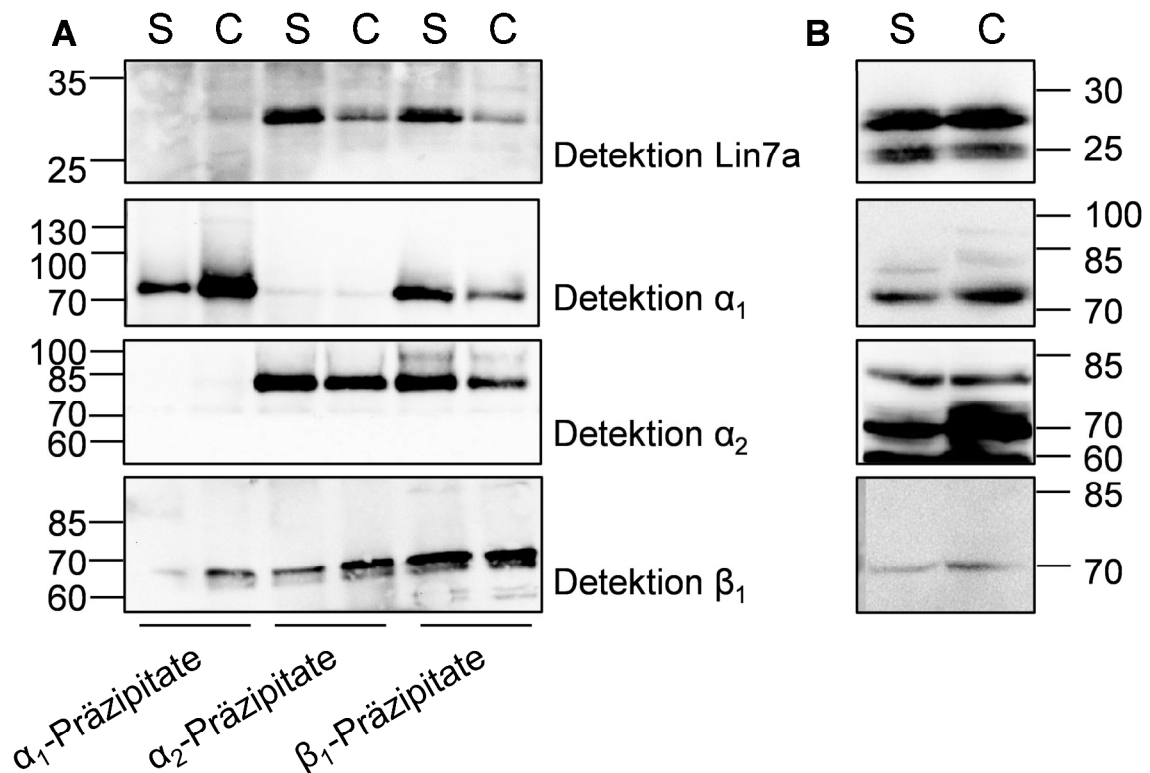
Westernblotanalyse der mit anti-XFP immunpräzipitierten Cytosole von transient transfizierten HEK293-Zellen. Die transfizierten Konstrukte sind über den Blots angegeben. Präzipitate wurden mit anti- $\alpha_2$  (EP073513) detektiert (oberer Blot). Die errechnete Größe des Fusionskonstruktes  $\beta_1\alpha_2$  liegt bei 163 kDa, damit entspricht die obere Bande der des Fusionskonstruktes. Inputs wurden mit anti-XFP (mittlerer Blot) und anti- $\beta_1$  (unterer Blot) detektiert. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Mit der Immunopräzipitation von überexprimiertem  $\beta_1\alpha_2$  über fluoreszenzproteinmarkiertes Lin7a lässt sich die Interaktion zwischen den beiden Proteinen bestätigen. Dabei sprechen die Ergebnisse für eine hauptsächlich PDZ-vermittelte Interaktion.

#### 4.2.5 Immunopräzipitation von endogenem Lin7a und den endogenen NOsGC-

##### *Untereinheiten $\alpha_1$ , $\alpha_2$ und $\beta_1$ mit Antikörpern gegen diese NOsGC-Untereinheiten*

Um festzustellen, ob eine Interaktion zwischen der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC und Lin7a auch endogen nachweisbar ist, wurden Immunopräzipitationen mit den entsprechenden Proteinen aus dem Gehirn von Mäusen durchgeführt. Die Erkenntnisse zur Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation in HEK293-Zellen und die Ergebnisse von Russwurm et al. (Russwurm et al. 2001) ließen eine Anreicherung der  $\alpha_2$ -Untereinheit und ihrer Bindungspartner in der synaptosomalen Fraktion vermuten. Deshalb wurde das Maushirnlisat für die Immunopräzipitation in grobes Synaptosom und cytosolische Fraktion aufgetrennt. Mit spezifischen Antikörpern gegen die NOsGC-Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  wurden mit beiden Fraktionen getrennt Immunopräzipitationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: In vivo Assoziation von endogenem Lin7a und endogener NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$**

A: Westernblotanalyse von Immunopräzipitaten aus synaptosomaler (S) und cytosolischer (C) Fraktion aus Maushirn. Präzipitiert wurde mit Antikörpern gegen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  (EP073512) und  $\beta_1$ . Präzipitate wurden detektiert mit Antikörpern gegen Lin7a,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  (EP073513) und  $\beta_1$ . B: Westernblotanalyse des eingesetzten Materials mit den gleichen Antikörpern wie bei der Detektion in A. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen von insgesamt 3 durchgeführten Versuchen.

Im  $\alpha_1$ -Präzipitat ist weder im Synaptosomen noch im Cytosol ein 27 kDa großes Lin7a nachweisbar (Abbildung 17A, oberere Blot, Spalten 1 und 2). In den Präzipitaten von  $\alpha_2$ - und  $\beta_1$ -Antikörpern hingegen lässt sich Lin7a nachweisen (Abbildung 17A, oberere Blot, Spalten 3 bis 6). Besonders stark sind die Banden dabei jeweils in der synaptosomalen Fraktion.

Weil die katalytisch aktive NOsGC in Heterodimeren vorliegt, erwarteten wir, dass in den Präzipitaten der Antikörper gegen  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Untereinheit jeweils die entsprechende  $\alpha$ -Untereinheit sowie die  $\beta_1$ -Untereinheit nachweisbar sind. In dem Präzipitat des  $\beta_1$ -Antikörpers erwarteten wir, alle drei Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  nachweisen zu können. Die Ergebnisse der unteren drei Blots in Abbildung 17A zeigen, dass das Ergebnis unseren Erwartungen entspricht. Mit einer Größe von 76 kDa lässt sich die  $\alpha_1$ -Untereinheit wie erwartet in den Präzipitaten von  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Antikörpern nachweisen. Mit dem  $\alpha_1$ -Antikörper lässt sich aus dem Cytosol mehr  $\alpha_1$ -Untereinheit präzipitieren als aus dem Synaptosom. Mit dem  $\beta_1$ -Antikörper lässt sich aus dem Cytosol dagegen weniger  $\alpha_1$ -Untereinheit präzipitieren als aus dem Synaptosom (Abbildung 17A, zweiter Blot). Die 83 kDa große  $\alpha_2$ -Untereinheit lässt sich in den Präzipitaten von  $\alpha_2$ - und  $\beta_1$ -Antikörpern nachweisen (Abbildung 17A, dritter Blot). Dabei ist das Signal von der  $\alpha_2$ -Untereinheit, die mit dem  $\beta_1$ -Antikörper aus der cytosolischen Fraktion präzipitiert wurde, am schwächsten. Die  $\beta_1$ -Untereinheit ist 71 kDa groß und in allen Präzipitaten enthalten, auch wenn das Signal im synaptosomalen Präzipitat mit anti- $\alpha_1$ -Antikörper sehr schwach ist (Abbildung 17A, vierter Blot).

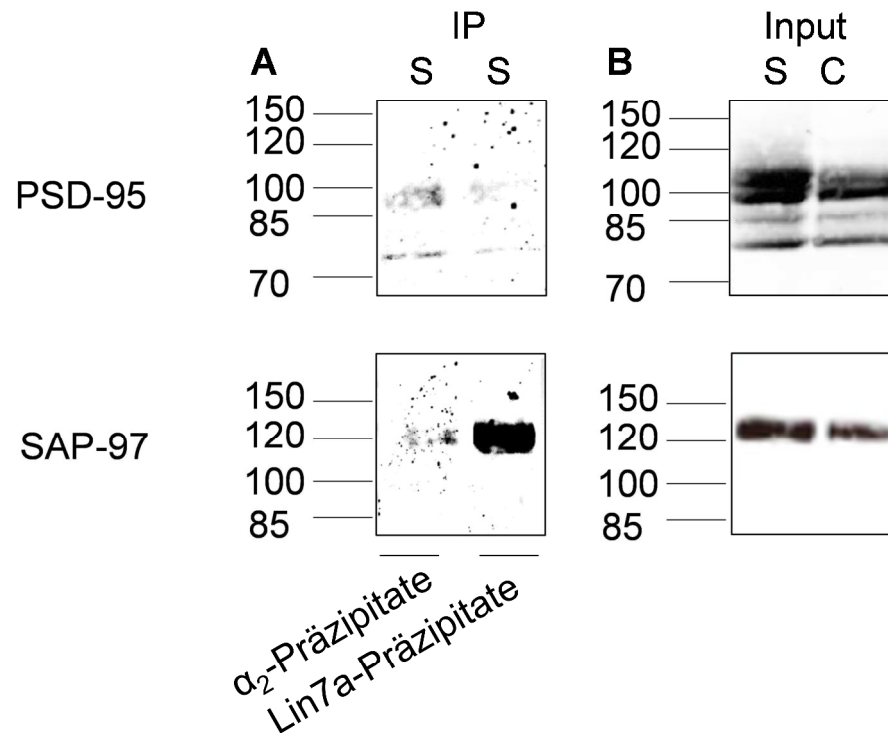
Das zur Präzipitation eingesetzte Synaptosom und Cytosol wurden auch direkt im Westernblot analysiert (Abbildung 17B). Lin7a,  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  sind in dem eingesetzten Material etwa in vergleichbarer Konzentration vorhanden, lediglich die mit  $\alpha_1$  korrespondierende Bande ist in der cytosolischen Fraktion stärker als in der synaptosomalen Fraktion.

Die Interaktion zwischen Lin7a und der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  lässt sich nicht nur zwischen überexprimierten Proteinen aus HEK293-Zellen, sondern auch zwischen endogenen Proteinen aus Maushirn nachweisen. Dabei ist auffällig, dass die Interaktion zwischen  $\alpha_2$  und Lin7a im Synaptosom stärker ist als im Cytosol, obwohl beide Interaktionspartner in Synaptosom und Cytosol in vergleichbaren Mengen enthalten waren.

#### 4.2.6 Immunopräzipitation der endogenen Gerüstproteine PSD-95 und SAP97 mit Antikörpern gegen die NOsGC-Untereinheit $\alpha_2$ und das Adapterprotein Lin7a

Die Interaktion zwischen endogenem Lin7a und dem endogenen NOsGC-Heterodimer  $\alpha_2\beta_1$  lässt sich über Immunopräzipitation aus Maushirn nachweisen (siehe oben). Wir wollten überprüfen, ob die bereits etablierten Interaktionen zwischen der  $\alpha_2$ -Untereinheit und den Gerüstproteinen PSD-95 und SAP-97 sowie zwischen Lin7a und diesen beiden Proteinen unter den gleichen Bedingungen nachweisbar sind.

Westernblots des eingesetzten Materials zeigen, dass sowohl PSD-95 als auch SAP-97 in der synaptosomalen Fraktion wie erwartet etwas höher konzentriert vorliegen, als es in der cytosolischen Fraktion der Fall ist (Abbildung 18 B). Präzipitationen wurden jeweils nur mit der synaptosomalen Fraktion durchgeführt. Abbildung 18 A zeigt den Versuch, in den Präzipitationen von  $\alpha_2$ -Antikörper und Lin7a-Antikörper PSD-95 und SAP-97 nachzuweisen: PSD-95 lässt sich weder mit  $\alpha_2$  noch mit Lin7a präzipitieren. SAP-97 ist im Präzipitat des Lin7a-Antikörpers deutlich nachweisbar. Diese Interaktion, die über die L27-Domänen von Lin7a und SAP-97 vermittelt ist, wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Karnak et al. 2002; Leonoudakis et al. 2004; Bohl et al. 2007; Hauri et al. 2013). Im Präzipitat des  $\alpha_2$ -Antikörpers zeigt sich jedoch auch für SAP-97 keine Bande. Der Nachweis der von Russwurm et al. beschriebenen Interaktion zwischen der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  und PSD-95 sowie zwischen  $\alpha_2\beta_1$  und SAP-97 konnte zwischen endogen exprimierten Proteinen im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden.



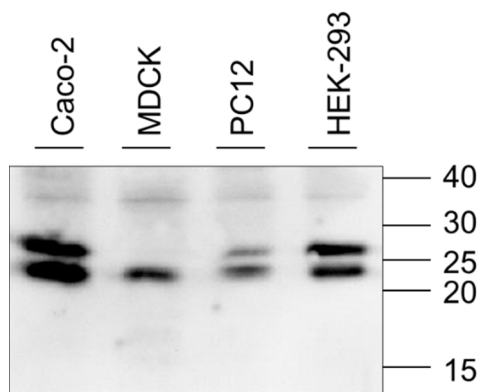
**Abbildung 18: In vivo Assoziation von endogenem PSD-95 und SAP-97 mit der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  und Lin7a**

*A* Westernblotanalyse von Immunopräzipitaten aus synaptosomaler (S) Fraktion aus Maushirn. Präzipitiert wurde mit Antikörpern gegen  $\alpha_2$  (EP073512) und Lin7a, detektiert mit Antikörpern gegen PSD-95 und SAP97  
*B* Westernblotanalyse des eingesetzten Materials und der jeweiligen cytosolischen Fraktion mit den gleichen Antikörpern. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

#### 4.2.7 Knockdown von Lin7a in HEK293-Zellen

Neben HEK293-Zellen weisen auch eine Reihe anderer Zelllinien Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Fusionskonstruktes  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  auf: In Caco-2 und PC12-Zellen ist eine deutliche Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation zu beobachten (Haase 2010). Auch in MDCK-Zellen ist eine membranäre Lokalisation erkennbar, sie ist im Vergleich diffuser (Baumgarten 2017).

Es sollte überprüft werden, ob Lin7a in den Zelllinien, die eine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zeigen, endogen exprimiert wird. Dafür wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der jeweiligen cytosolischen Fraktion auf das Vorhandensein von Lin7a mit spezifischem Antikörper geprüft. Lin7a wird sowohl in Caco-2-Zellen und PC12-Zellen als auch in HEK293-Zellen endogen exprimiert (Abbildung 19). Dabei entspricht das 27 kDa große Lin7a jeweils der oberen Bande einer Doppelbande. Die untere Bande zeigt die kleineren Isoformen der Lin7-Proteine: Lin7b und Lin7c. MDCK-Zellen zeigen eine einzelne Bande auf der Höhe von Lin7b/c. Allerdings ist der Vergleich nur eingeschränkt möglich, da MDCK-Zellen caninen Ursprungs sind und die Spezifität des Lin7a-Antikörpers für die Spezies Hund nicht bekannt ist.



**Abbildung 19: Endogene Expression von Lin7a in unterschiedlichen Zelllinien**

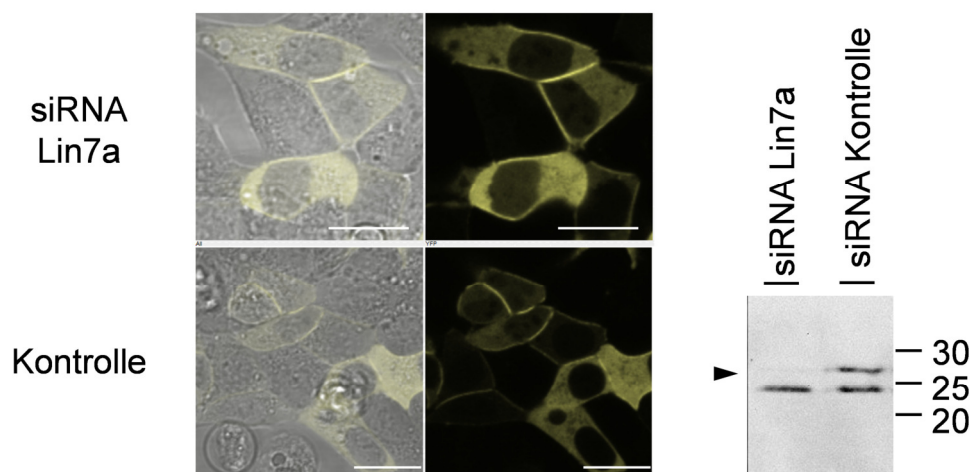
Cytosolische Fraktionen der Zelllinien Caco-2, MDCK, PC12 und HEK-293 wurden analysiert. Verwendeter Antikörper: anti-Lin7a. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Dominant negative Deletionsmutanten von Lin7a verdrängen die Isoform  $\alpha_2\beta_1$  von Zell-Zell-Kontakten. Es liegt die Vermutung nahe, dass analog zu dieser Verdrängung auch dann die subzelluläre Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$  beeinträchtigt ist, wenn die Bildung von Lin7a unterdrückt wird. Durch die Transfektion mit siRNA, die in die Proteinbiosynthese eingreift, kann dieser Effekt erzielt werden. Diese Technik wurde gewählt, um zu prüfen, ob das Fehlen von Lin7a einen Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  hat. Dafür wurden gegen Lin7a gerichtete siRNA und das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  transient in HEK293-Zellen transfiziert. Nach der mikroskopischen Untersuchung erfolgte die Analyse durch Westernblot. Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit *nonsens*-siRNA und dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  transfiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Der Westernblot der Kontrolle zeigt eine Doppelbande, von der die obere Bande mit 27 kDa Lin7a entspricht (Abbildung 20). Der Ansatz, der mit der siRNA gegen Lin7a transfiziert wurde, zeigt eine einzelne Bande bei 23 kDa, die Lin7b und Lin7c zuzuordnen ist. Durch den Einsatz von siRNA ist es folglich gelungen, die Bildung von endogenem Lin7a in HEK293-Zellen zu unterbinden. Überras-

schenderweise zeigte die mikroskopische Analyse der gleichen Proben, dass  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  trotzdem an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Lin7c und Lin7b das Fehlen von Lin7a kompensieren. Diese Kompensation konnte in Knock-out Mäusen bereits nachgewiesen werden (Misawa et al. 2001). In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass Lin7b und Lin7c nicht herunterreguliert wurden. Es ist also möglich, dass die anderen Isoformen die Aufgabe,  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an Zell-Zell-Kontakte zu dirigieren, übernehmen. Eine andere Erklärung für das Ausbleiben eines Effektes ist, dass kleine Mengen an Lin7a trotz des Einsatzes der siRNA exprimiert wurden und diese kleinen Mengen an Adapterprotein für eine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ausreichend sind.

Im Gegensatz zu der Transfektion dominant negativ wirkender Deletionsmutanten von Lin7a, zeigt das Herunterregulieren durch siRNA keinen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ .

#### 4.2.8 Knockdown von Scribble in HEK293-Zellen



**Abbildung 20: Einfluss des Herunterregulierens von Lin7a in HEK293-Zellen auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$**

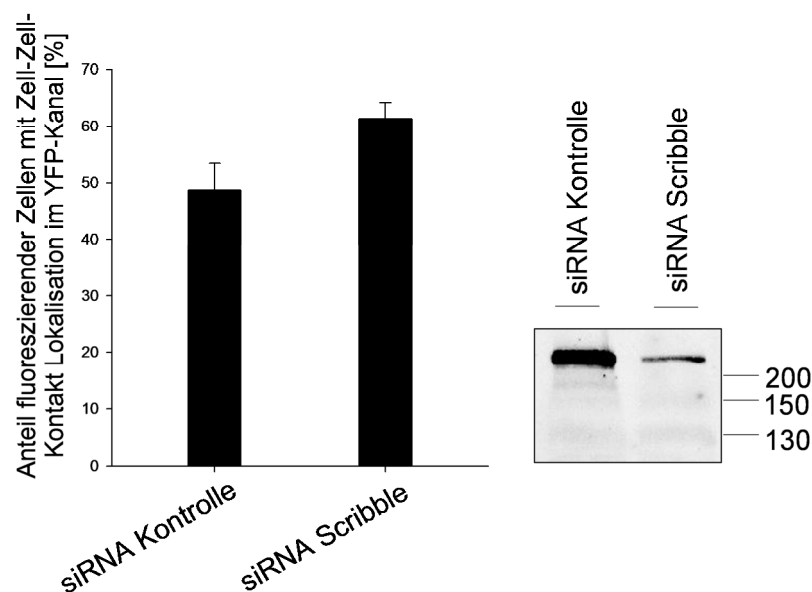
Mikroskopische Aufnahme von HEK293-Zellen, die durch Transfektion von siRNA gegen Lin7a weniger Lin7a gebildet haben oder als Kontrolle nonsens-siRNA transfiziert wurden. Das 24 Stunden später transfizierte  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ist in beiden Fällen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Der Westernblot zeigt Cytoplasten der unter dem Mikroskop untersuchten Proben, aufgetragen wurden 70  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein, detektiert wurde mit Lin7a-Antikörper. Lin7a ist 27kDA groß und nur in der Probe der Kontrolle nachweisbar.

Um die Interaktion zwischen dem Polaritätsprotein Scribble und der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  weiter zu charakterisieren, wurde auch Scribble mit Hilfe einer gegen Scribble gerichteten siRNA herunterreguliert. Mareike Busker kam in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass Scribble mit  $\beta_1\alpha_2$  interagiert, diese Interaktion aber nicht für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation dieser Isoform verantwortlich ist. Zum einen ist  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  auch in PC12-Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, obgleich Scribble in PC12-Zellen nicht exprimiert wird; zum anderen



führt eine Kotransfektion von Scribble in HEK293-Zellen nicht zu einer Zunahme der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation, sondern sogar zu einer leichten Abnahme (nicht statistisch signifikant, Busker 2013). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte RNAi-Experimente bestätigen die Ergebnisse von Busker (Abbildung 21): In Proben, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, liegt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in  $49 \pm 6$  % der Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert vor. In den Ansätzen, die mit siRNA gegen Scribble transfiziert wurden, ist  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in  $61 \pm 4$  % der Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Das Ergebnis zeigt eine Zunahme der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation durch Transfektion mit siRNA gegen Scribble. Allerdings ist der Unterschied nicht statistisch signifikant. Die Westernblotanalyse zeigt, dass durch die verwendete siRNA kein kompletter *Knock-out* gelungen ist. Eventuell sind die Ergebnisse weniger ausgeprägt und nicht statistisch signifikant, weil Scribble in geringerem Umfang weiterhin exprimiert wurde.

Das Herunterregulieren von Scribble führt zu einer Zunahme der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation. Dadurch wird die These gestützt, dass Scribble mit dem Komplex konkurriert, der  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an Zell-Zell-Kontakte dirigiert.

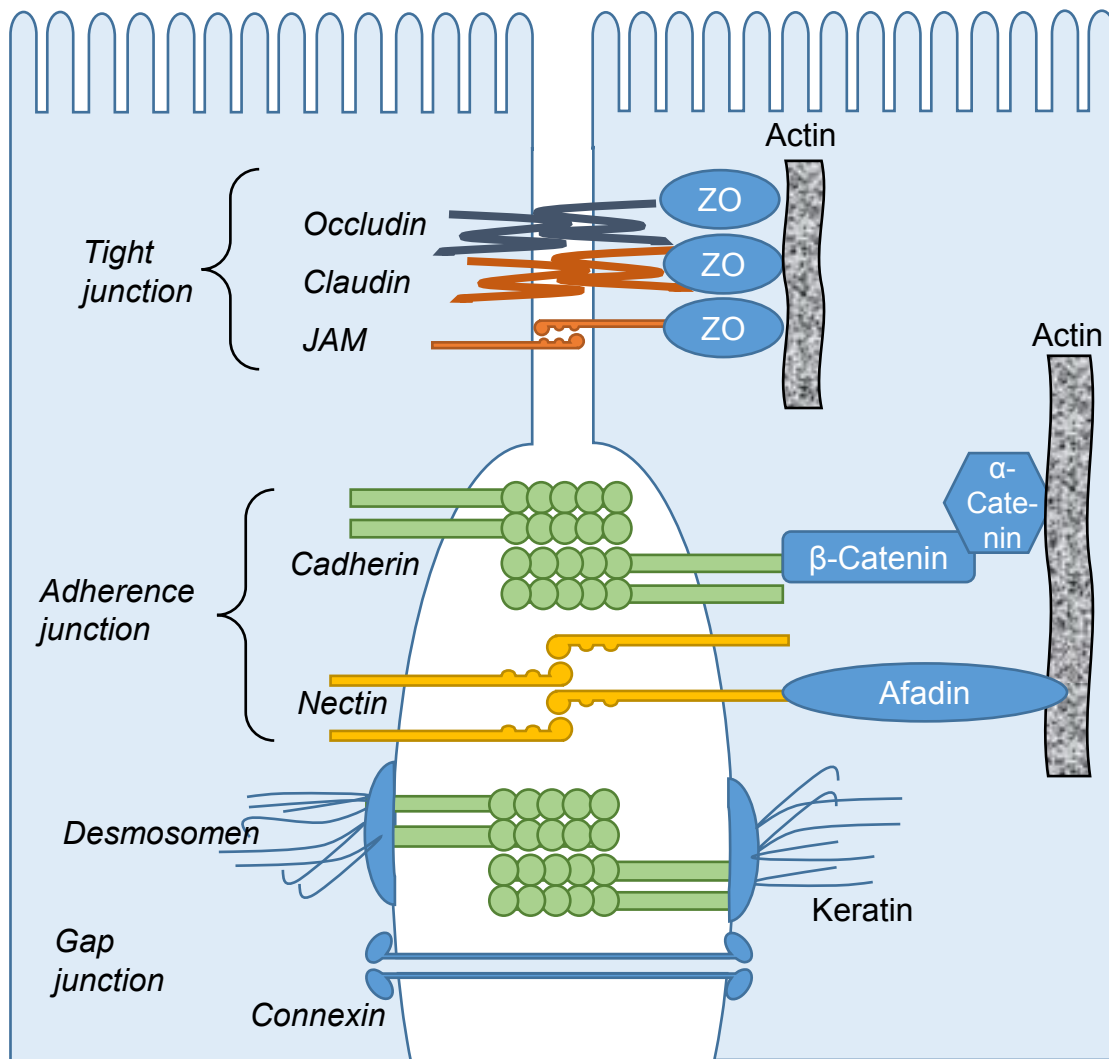


**Abbildung 21: Einfluss des Herunterregulierens von Scribble in HEK293-Zellen auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$**

HEK293-Zellen wurden entweder mit siRNA gegen Scribble oder als Kontrolle mit zu keiner mRNA passender siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  transfiziert und 48 h nach dieser zweiten Transfektion im CLSM analysiert. Dargestellt ist der Anteil an Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten im YFP-Kanal in Prozent als Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei ausgewerteten Bildern. Der Westernblot zeigt, exemplarisch aus einem Versuch, Membranfraktionen der unter dem Mikroskop untersuchten Proben. Aufgetragen wurden 100  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein, detektiert wurde mit Scribble-Antikörper.

### 4.3 Charakterisierung des an der Lokalisation von $\alpha_2\beta_1$ beteiligten Zell-Adhäsions-Systems

Epitheliale Zell-Zell-Kontakte weisen verschiedene Verbindungs-Komplexe auf: *gap junctions*, *adherence junctions*, *tight junctions* und *Desmosomen*. Diese Komponenten sind in polarisierten Zellen klar voneinander abgegrenzt und an dem Zell-Zell-Kontakt von der basalen Seite über die *adherence junctions* hin zu den apikalen *tight junctions* starr organisiert. Dabei nehmen die Verbindungstypen unterschiedliche Rollen ein. *Tight junctions* sind Diffusionsbarrieren und regulieren die parazelluläre Permeabilität des Epithels (*barrier*-Funktion). Außerdem verhindern sie die Diffusion der Membrankomponenten innerhalb der Zellmembran und sind so an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt (*fence*-Funktion, Diamond 1977). Die entscheidenden transmembranären Proteine, aus denen *Tight junctions* aufgebaut sind, sind die Claudine. *Adherence junctions* verbinden die Zellen mechanisch miteinander und sorgen für den interzellulären Zusammenhalt. Sie bestehen aus Zelladhäsionsmolekülen (auch CAMs, englisch für *cell adhesion molecule*), die über Adapterproteine mit dem Cytoskelett verbunden sind, aber auch an intrazellulären Signalwegen beteiligt sind (Vasioukhin und Fuchs 2001). Im Endothel sind die Verbindungstypen im Gegensatz zum Epithel weniger stringent voneinander getrennt (Dejana 2004). Die unterschiedlichen Zell-Zell-Verbindungen in polarisierten Zellen sind in Abbildung 22 abgebildet.



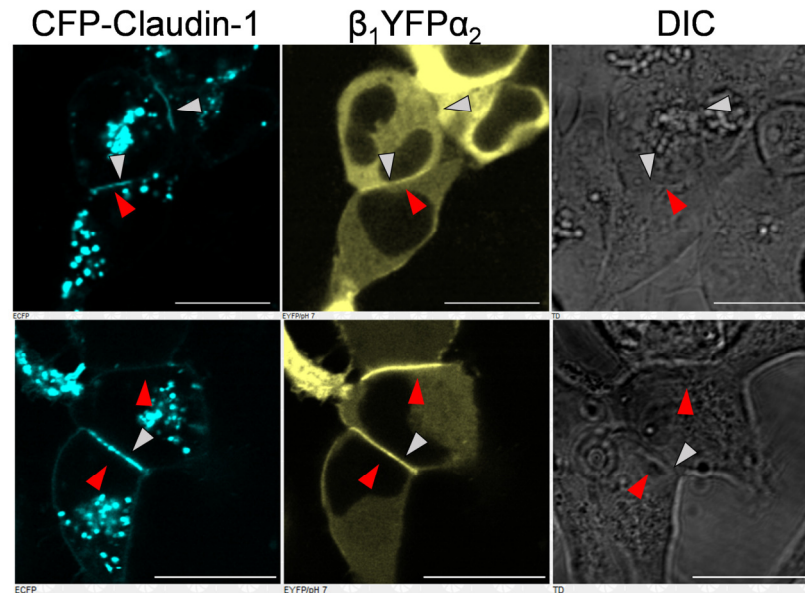
**Abbildung 22: Unterschiedliche Zell-Zell-Verbindungen in einer polarisierten Zelle**

In Epithelzellen sind tight junctions an der apikalen Seite lokalisiert: Junctional Adhesion molecules (JAM), Claudin und Occludin sind über Zonula Occludentes (ZO) an Aktin gebunden. Adherence Junctions sind aus dem Cadherin-Catenin System und dem Nectin-Afadin-System aufgebaut. Desmosomen kommen in Zellen mit intensiver mechanischer Belastung vor. Es bildet sich eine Zytoplasmalplatte aus Desmoplakin, in der Keratinfilamente verankert ist. Cadherine stellen die Verbindung zur Nachbarzelle her. Gap junctions bestehen aus Zell-Zell-Kanälen, durch die Ionen oder kleine Moleküle diffundieren können. Dazu lagern sich meist sechs transmembranäre Connexine zu einem Connexon zusammen.

#### 4.3.1 Subzelluläre Lokalisation von $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ bei Kotretransfektion mit Claudin-1

HEK293-Zellen sind frei von tight junctions. Durch die Transfektion von Claudinen können HEK293-Zellen tight junctions-Stränge bilden (Piontek et al. 2008). Durch die Kotretransfektion des tight junction-Proteins Claudin-1 mit  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  wurde geprüft, ob die Ausbildung von tight junction-Strängen Einfluss auf die Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an Zell-Zell-Kontakten nimmt. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass die Lokalisation von Claudin-1 und  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  unabhängig voneinander ist. Es gibt Zell-Zell-Kontakte, die ein verstärktes Fluoreszenzsignal sowohl im CFP- als auch im YFP-Kanal zeigen. An diesen Kontakten sind sowohl Claudin-1 als auch  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  lokalisiert. Dabei ist Claudin-1 am Zell-Zell-Kontakt weniger gleichmäßig verteilt.

Der obere Bildausschnitt zeigt eine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von Claudin-1, ohne dass  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an diesem Kontakt lokalisiert ist. Der zweite Bildausschnitt zeigt neben dem gemeinsamen Zell-Zell-Kontakt einen Kontakt mit  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ohne Claudin-1. Das Konstrukt scheint die Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  also weder zu begünstigen noch zu verhindern.



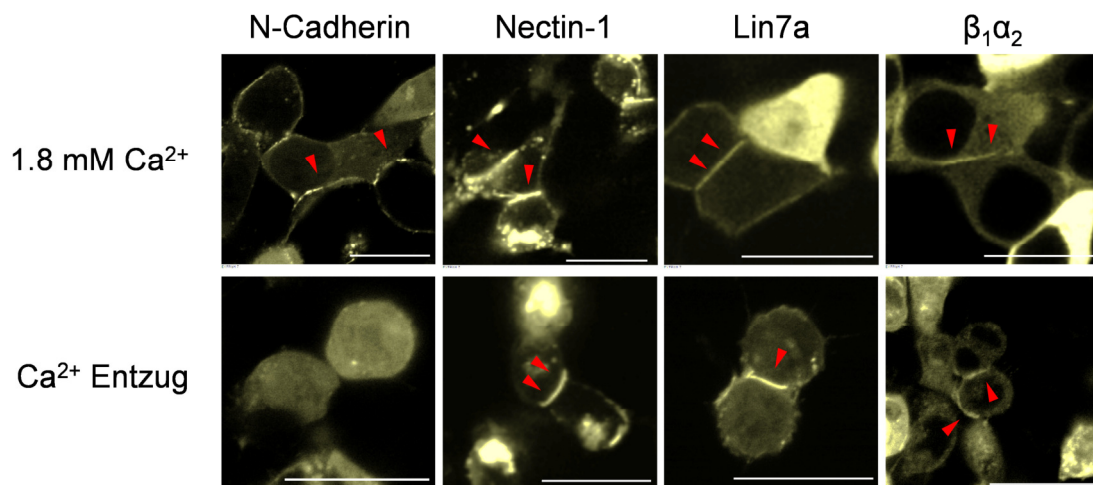
**Abbildung 23:** Voneinander unabhängige Lokalisation von CFP-Claudin-1 und  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in HEK293-Zelle. Rote Pfeile zeigen auf Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ . Graue Pfeile zeigen auf Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von CFP-Claudin-1. Balken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ . Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

#### 4.3.2 Unabhängigkeit der subzellulären Lokalisation von Lin7a und $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ von extrazellulärem Calcium

Man unterscheidet zwischen zwei CAM-Gruppen, die für *Adherence junctions* entscheidend sind: den calciumabhängigen und den calciumunabhängigen CAMs. Unter den calciumabhängigen CAMs spielt die Cadherin-Familie eine besonders wichtige Rolle. Cadherine haben sechs extrazelluläre Domänen. Ist extrazelluläres Calcium vorhanden, dimerisieren Cadherine und leiten so ein Zusammenlagern mehrerer Cadherindimere ein (Gumbiner 2005). Nectine gehören zu den calcium-unabhängigen CAMs.

Um herauszufinden, an welcher Art von Zell-Zell-Kontakten Lin7a und das Heterodimer  $\alpha_2\beta_1$  lokalisiert sind, wurde HEK293-Zellen, die fluoreszenzmarkiertes Lin7a oder das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  exprimierten, extrazelluläres Calcium entzogen. Parallel wurde ein Calciumentzug bei Zellen durchgeführt, die fluoreszenzmarkiertes N-Cadherin beziehungsweise Nectin-1 exprimierten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. Unter normalen Kulturbedingungen in DMEM sind alle vier Konstrukte an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Nach drei Stunden Inkubation in PBS, welches kein Calcium enthält, runden sich die Zellen ab. Dafür sind endogene calciumabhängige CAMs verantwortlich. Obwohl die Zellen ihre cha-

rakteristische Form verlieren, gibt es Membranabschnitte, an denen sich Zellen berühren. Wie erwartet verschwindet das fluoreszierende N-Cadherin von diesen Zell-Zell-Kontakten. Die Zellen, in denen Nectin-1 überexprimiert wurde, runden sich weniger ab als die anderen Zellen. Das fluoreszierende Nectin-1 ist auch unter Calciumentzug an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Auch Lin7a und das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  sind unter Calciumentzug weiterhin an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Ihre Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation ist demnach über calciumunabhängige CAMs vermittelt.



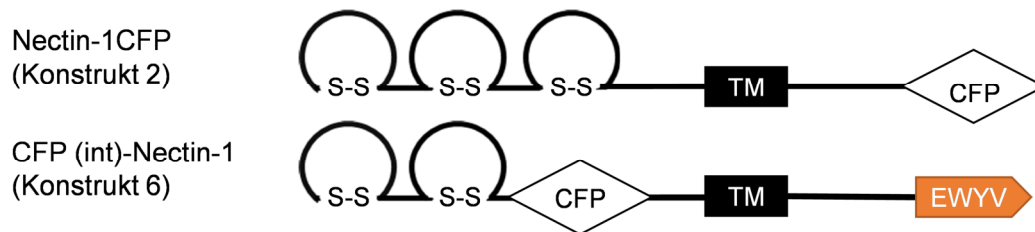
**Abbildung 24:** Auswirkungen von extrazellulärem Calciumentzug auf die Lokalisation von mit YFP markierten Proteinen N-Cadherin, Nectin1, Lin7a und dem NOsGC-Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in HEK293-Zellen

Entsprechende Konstrukte wurden transient in HEK293-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden Kultivierung in DMEM (enthält 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) für drei Stunden mit calciumfreiem PBS inkubiert. Rote Pfeile zeigen auf Zell-Zell-Kontakt-Lokalisationen der gelb fluoreszierenden Konstrukte. Balken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ . Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

#### 4.3.1 Subzelluläre Lokalisation von $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ bei Kotransfektion mit Nectin-1

Nectine sind die wichtigsten Vertreter der calciumunabhängigen CAMs (Takai et al. 2003). Weil  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  gemäß der Vorergebnisse über calciumunabhängige CAMs an Zell-Zell-Kontakte dirigiert wird, stellten wir die Hypothese auf, dass Nectin-1 als indirekter Interaktionspartner an der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Fusionskonstruktes  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  beteiligt ist. Eine solche Interaktion ist über das PDZ-Bindemotiv von Nectin-1 denkbar, welches an das Aktin-bindende Protein Afadin, aber auch an verschiedene Gerüstproteine bindet (Takai et al. 2003). Um eine mögliche Interaktion zwischen Nectin-1 und dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  nachzuweisen, klonierten wir ein fluoreszenzproteinmarkiertes Nectin-Konstrukt mit intaktem PDZ-Bindemotiv (CFP(int)-Nectin-1, Konstrukt 6) und ein Konstrukt, dem das PDZ-Bindemotiv fehlt (Nectin-1CFP, Konstrukt 2). Die verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 25 dargestellt. Das carboxyterminal CFP-markierte Konstrukt 2 kann ohne PDZ-

Bindemotiv nicht mit Gerüstproteinen interagieren. Wir erwarteten, dass dieses Konstrukt das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  analog zu den Deletionsmutanten von Lin7a (vgl. Kapitel 4.2.3) vom Zell-Zell-Kontakt verdrängt.



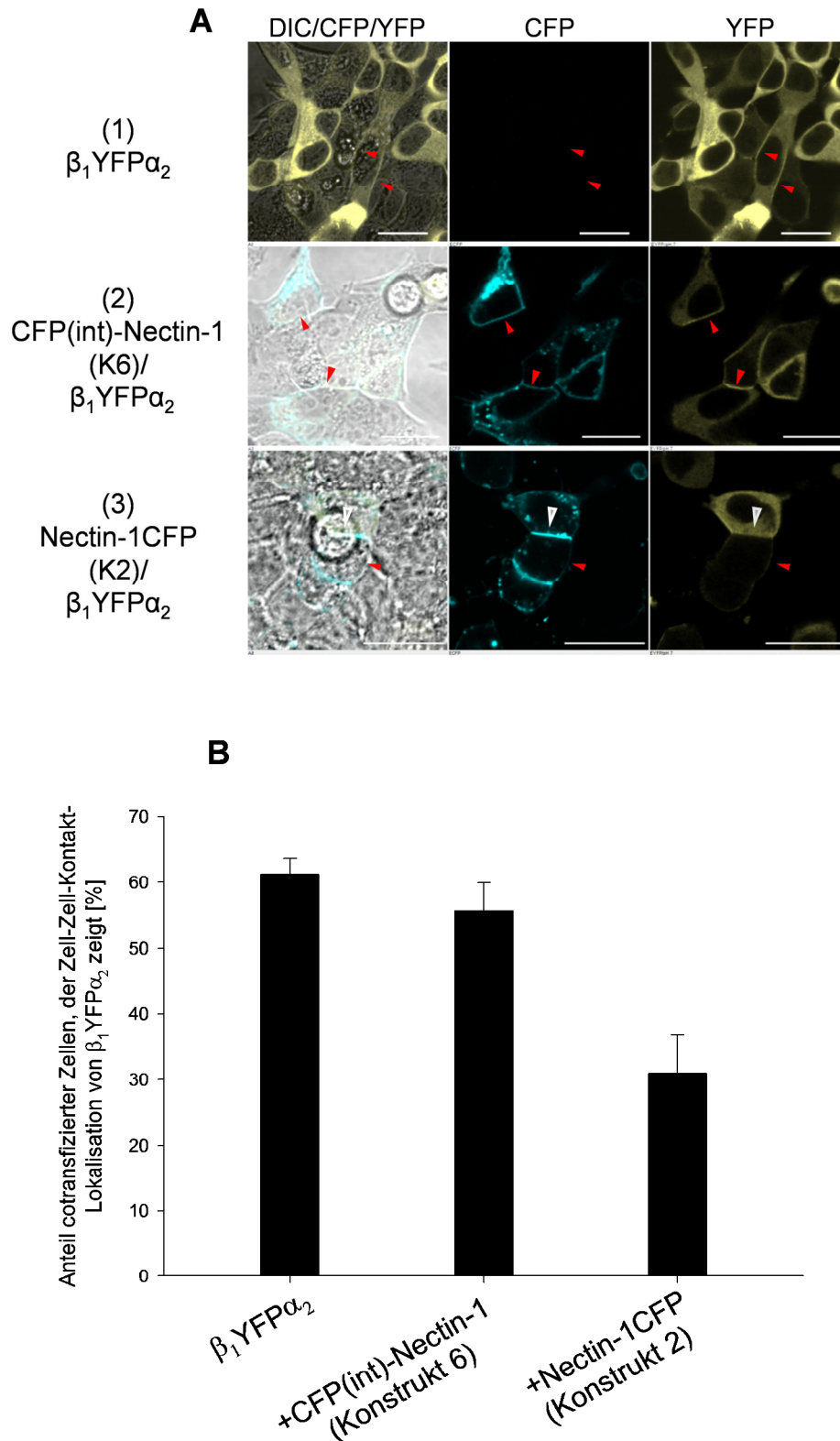
**Abbildung 25: Schematische Darstellung der mit  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  kotransfizierten Nectinkonstrukte**

Bei dem Nectin-1CFP (Konstrukt 2) fehlt das PDZ-Bindemotiv, stattdessen ist der restliche Teil von Nectin-1 carboxyterminal mit dem Fluoreszenzprotein CFP fusioniert. CFP(int)-Nectin-1 (Konstrukt 6) ist im extrazellulären Bereich des Proteins mit einem innen liegenden CFP markiert.

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung mit dem CLSM.  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ist wie oben berichtet an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. CFP(int)-Nectin-1 (Konstrukt 6) ist ebenfalls an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Das Fluoreszenzsignal dieses extrazellulär markierten Konstruktes zieht sich fein um die Zellen herum, die an andere Zellen angrenzen. Die roten Pfeile in Abbildung 26A (2) deuten auf Zell-Zell-Kontakte, bei denen eine Kolo-kalisation von CFP(int)-Nectin-1 und  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zu erkennen ist. Die Lokalisation von Nectin-1CFP (Konstrukt 2) unterscheidet sich von der des extrazellulär markierten Nectinkonstruktes. Zwischen Zellen, die beide Nectin-1CFP exprimieren, tritt ein besonders starkes CFP-Signal auf (Abbildung 26A (3), grauer Pfeil). An Membranabschnitten zu nicht-transfizierten Zellen ist keine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von Nectin-1CFP zu erkennen. Mit Nectin-1CFP kotransfiziertes  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ist nicht an den Membranabschnitten mit starkem CFP-Signal lokalisiert.  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ist ausschließlich an den Membranabschnitten zu untransfizierten Zellen, also an Abschnitten ohne CFP-Signal, lokalisiert (Abbildung 26A (3), roter Pfeil). Abbildung 26B zeigt den Anteil der kotransfizierten Zellen, der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zeigt. In dieser Versuchsreihe ist das allein transfizierte  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in  $61,3 \pm 2,4 \%$  der Zellen an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert. Nectin-1CFP (Konstrukt 2) verringert die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  auf  $31 \pm 5,9 \%$ , während die Kotransfektion von CFP(int)-Nectin-1 (Konstrukt 6) keinen Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  hat ( $55,7 \pm 4,3 \%$ ). Allerdings zeigen die Ergebnisse nur einen Trend und keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Das Nectinkonstrukt Nectin-1CFP (Konstrukt 2) ohne PDZ-Bindemotiv verdrängt das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  wie vermutet von den Zell-Zell-Kontakten. Allerdings ist das Ergebnis weniger eindeutig als der dominant negative Effekt der Deletionsmutanten von Lin7a. Der Anteil an Zellen mit Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ist bei Kotransfektion mit Nectin-1CFP (Konstrukt 2) nicht signifikant niedriger als ohne Kotransfektion des Nectinkonstrukts.





**Abbildung 26: Einfluss der Nectin-Konstrukte auf die Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$**

A Mikroskopische Analyse der Konstrukte CFP(int)-Nectin-1 und Nectin-1CFP kotransfiziert mit  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  in HEK293-Zellen. Rote Pfeile kennzeichnen Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ ; der graue Pfeil zeigt auf einen Zell-Zell-Kontakt, an dem ein starkes CFP-Signal, aber keine Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zu erkennen ist. Balken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ . B: Anteil an Zellen mit fluoreszierenden Zell-Zell-Kontakten im YFP-Kanal von allen transient kotransfizierten Zellen in Prozent. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils drei ausgewerteten Bildern.



#### 4.3.2 Interaktion mit dem Gerüstprotein MPP3

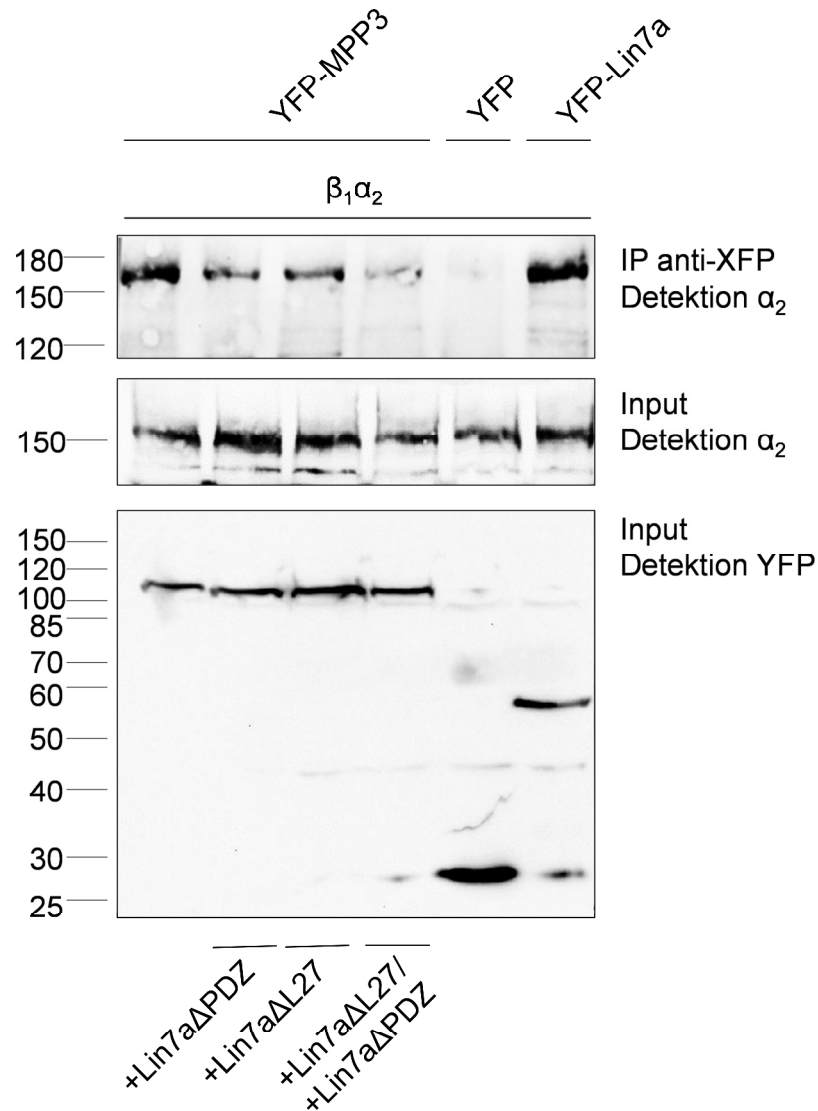
MPP3 wurde über Affinitätschromatographie und anschließende Massenspektrometrie als potenzieller Interaktionspartner der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC identifiziert (Hochheiser et al. 2016). Es interagiert sowohl über eine L27-Domäne mit Lin7a (Kamberov et al. 2000) als auch über die Typ 2-PDZ-Domäne mit Nectin-1 (Dudak et al. 2011). Damit ist MPP3 ein mögliches Bindeglied zwischen dem Calcium-insensitiven CAM aus der Familie der Nectine und Lin7a, dem direkten Interaktionspartner der NOsGC-Isoform  $\beta_1\alpha_2$ .

##### 4.3.2.1 Immunopräzipitation des NOsGC-Fusionskonstruktes $\beta_1\alpha_2$ mit YFP-MPP3

Für die Untersuchung einer möglichen indirekten Interaktion zwischen MPP3 und  $\beta_1\alpha_2$  wurden fluoreszenzproteinmarkiertes MPP3 und das Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$  gemeinsam in HEK293-Zellen exprimiert und nach der Cytosolgewinnung mit einem Antikörper gegen das Fluoreszenzprotein präzipitiert. Parallel wurde untersucht, ob eine solche Interaktion durch die Kotransfektion einzelner Domänen von Lin7a unterbunden werden kann. Als Negativkontrolle wurden  $\beta_1\alpha_2$  und das Fluoreszenzprotein YFP in HEK293-Zellen kotransfiziert. Das einzelne Fluoreszenzprotein sollte nicht in der Lage sein,  $\beta_1\alpha_2$  zu binden. Als Positivkontrolle wählten wir den bereits identifizierten direkten Interaktionspartner von  $\beta_1\alpha_2$ : YFP-Lin7a.

Tatsächlich ließ sich das Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$  in dem Präzipitat von YFP-MPP3 nachweisen (Abbildung 27, oberer Blot, erste Spalte). Die Bande lässt vermuten, dass  $\beta_1\alpha_2$  über endogenes Lin7a mit YFP-MPP3 interagiert. Wie erwartet führen die Deletionsmutanten Lin7a $\Delta$ PDZ und Lin7a $\Delta$ L27 zu einer deutlichen Abschwächung dieser Interaktion zwischen YFP-MPP3 und  $\beta_1\alpha_2$ . Dabei interagiert die einzelne L27-Domäne vermutlich mit der L27-Domäne von YFP-MPP3. Dieses steht dann nicht mehr für die Interaktion mit dem Komplex aus endogenem Lin7a und  $\beta_1\alpha_2$  zur Verfügung. Analog schirmt die einzelne PDZ-Domäne von Lin7a das PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit ab, sodass  $\beta_1\alpha_2$  nicht mehr mit dem Komplex aus YFP-MPP3 und endogenem Lin7a interagieren kann. Die Kotransfektion beider Deletionsmutanten von Lin7a zusammen unterbindet die Interaktion zwischen YFP-MPP3 und  $\beta_1\alpha_2$  fast vollständig (Abbildung 27, oberer Blot, vierte Spalte). In dem Präzipitat von YFP-Lin7a lässt sich wie erwartet  $\beta_1\alpha_2$  nachweisen. Das Fluoreszenzprotein allein zeigt keine Interaktion mit  $\beta_1\alpha_2$ . Die unteren beiden Blots zeigen die eingesetzten Cytosole. Das Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$  wurde in allen Ansätzen gleichmäßig exprimiert. Die YFP-enthaltenden Konstrukte wurden über das Fluoreszenzprotein nachgewiesen. Sie sind unterschiedlich groß. In den ersten vier Proben wurde 105 kDa großes YFP-MPP3 gleichmäßig exprimiert. Das einzelne Fluoreszenzprotein YFP zeigt bei 27 kDa eine etwas stärkere Bande. Die Expression von YFP-Lin7a war mit der Expression von YFP-MPP3 vergleichbar.

Die Immunopräzipitation zeigt eine deutliche Interaktion zwischen YFP-MPP3 und dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$ . Die Tatsache, dass beide Deletionsmutanten von Lin7a diese Interaktion unterbinden, unterstützt die Vermutung, dass MPP3 und das NOsGC Heterodimer  $\alpha_2\beta_1$  über Lin7a miteinander interagieren.



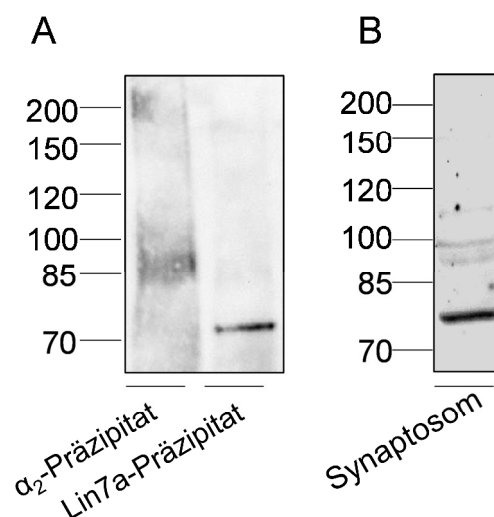
**Abbildung 27: Assoziation der NOsGC-Isoform  $\beta_1\alpha_2$  an YFP-MPP3**

Westernblotanalyse der mit anti-XFP immunpräzipitierten Cytosole von transient transfizierten HEK293-Zellen. Die transfizierten Konstrukte sind über und unter den Blots angegeben. Präzipitiert wurde mit anti-XFP. Präzipitate wurden mit anti- $\alpha_2$  (EP073513) detektiert (oberer Blot). Inputs wurden mit dem gleichen Antikörper (mittlerer Blot) und mit anti-XFP (unterer Blot) detektiert. Die einzelnen Domänen von Lin7a ließen sich im Westernblot mit dem Lin7a-Antikörper nicht nachweisen. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen von drei durchgeführten Versuchen.

#### 4.3.2.2 Immunopräzipitation von endogenem MPP3 mit Antikörpern gegen Lin7a und die $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC

In den vorherigen Versuchen wurde nachgewiesen, dass die überexprimierten Konstrukte  $\beta_1\alpha_2$  und YFP-MPP3 in HEK293-Zellen interagieren. Dabei erscheint eine indirekte Interaktion über das Adapterprotein Lin7a plausibel. Ziel dieser Untersuchung war es, die Interaktion zwischen MPP3, Lin7a und der Isoform  $\beta_1\alpha_2$  auch endogen nachzuweisen. Dafür wurden mit synaptosomaler Fraktion von Maushirn Immunopräzipitationen mit Antikörpern gegen die  $\alpha_2$ -Untereinheit und gegen Lin7a durchgeführt. Wir erwarteten, mit beiden Antikörpern MPP3 präzipitieren zu können.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Entgegen unseren Erwartungen wurde im Präzipitat des  $\alpha_2$ -Antikörpers kein MPP3 detektiert. Im Gegensatz dazu ließ sich im Präzipitat des Lin7a-Antikörpers mit dem MPP3-Antikörper ein 72 kDa großes Protein nachweisen. Auch direkt im Synaptosom wurde MPP3 auf dieser Höhe detektiert. Über die Laufweite von MPP3 in SDS-Gelen gibt es unterschiedliche Angaben. Dudak et al. konnten in COS-Zellen überexprimiertes humanes MPP3 sowohl auf der Höhe von 66 kDa als auch bei 75 kDa nachweisen. In Rattenhirn endogen exprimiertes MPP3 wies die Arbeitsgruppe sowohl bei 66 als auch bei 98 kDa nach (Dudak et al. 2011). Die Gruppe vermutet, dass posttranslationale Modifikationen für die verschiedenen Laufweiten verantwortlich sind.



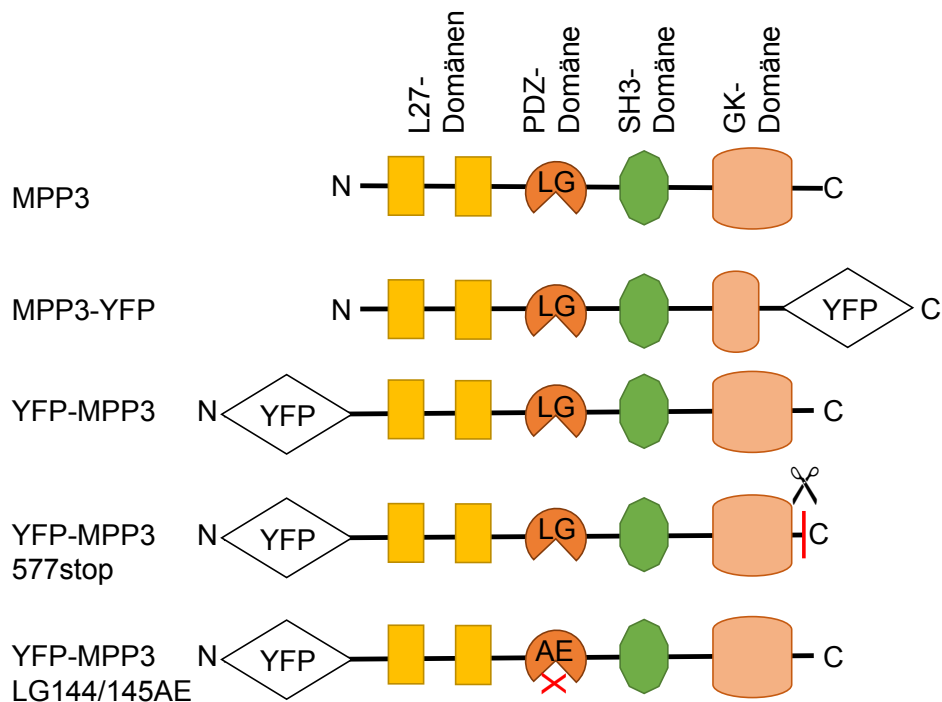
**Abbildung 28: In vivo Assoziation von endogenem MPP3 an endogenes Lin7a**

A: Westernblotanalyse der mit anti- $\alpha_2$  und anti-Lin7a immunpräzipitierter synaptosomaler Fraktion von Maushirn. Präzipitate wurden mit anti-MPP3 detektiert. B: Westernblotanalyse des eingesetzten Materials mit dem gleichen Antikörper. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Das Vorkommen eines ternären Komplexes aus MPP3, Lin7a und der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  konnte durch diesen Versuch nicht bestätigt werden. Die in der Literatur beschriebene Interaktion zwischen Lin7a und MPP3 (Kamberov et al. 2000; Karnak et al. 2002) ließ sich allerdings bestätigen.

## 4.4 Komplex zwischen Nectin-1, Lin7a und MPP3

### 4.4.1 Dirigieren von MPP3 mit intaktem Carboxyterminus durch Nectin-1 an die Membran



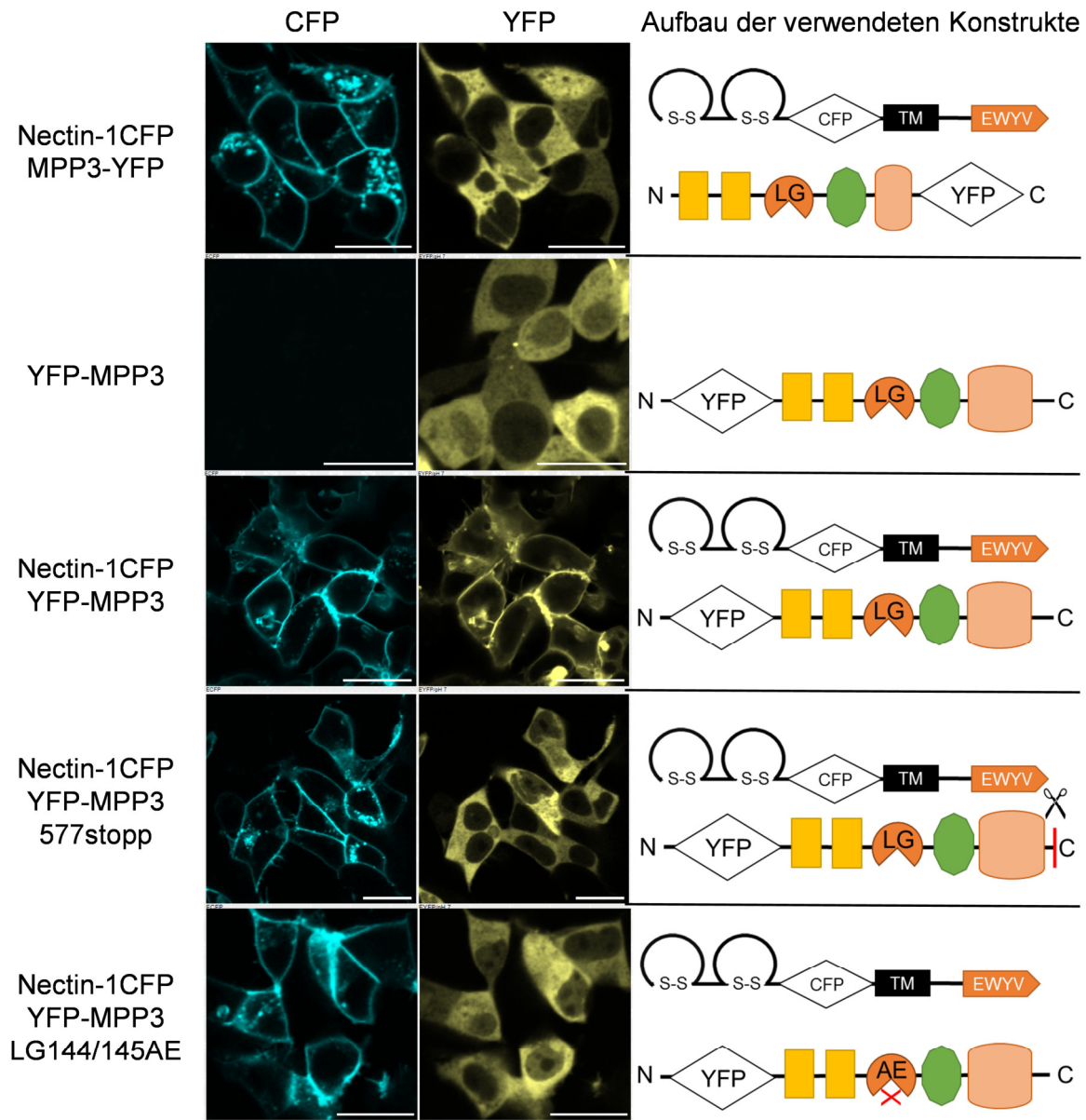
**Abbildung 29: Schematische Darstellung von MPP3 und den an unterschiedlichen Seiten fluoreszenzmarkierten MPP3-Konstrukten**

MPP3-YFP hat eine verkürzte GK-Domäne und carboxyterminales YFP, YFP-MPP3 ist aminoterminal markiert und verfügt über den vollständigen Carboxyterminus. Dem Konstrukt YFP-MPP3\_577stop fehlen am Carboxyterminus 8 Aminosäuren, die GK-Domäne ist noch vollständig erhalten. Bei dem Konstrukt YFP-MPP3 LG144/145AE führt die Mutation innerhalb der PDZ-Domäne dazu, dass sie kein PDZ-Bindemotiv mehr binden kann (Petit, M. M. R. et al. 2005).

Die Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3 wurde von Dudak et al. ausführlich untersucht (Dudak et al. 2011). Der cytosolische Carboxyterminus von Nectin-1 bildet ein PDZ-Bindemotiv, das mit der PDZ-Domäne von MPP3 interagiert. Von der amerikanischen Arbeitsgruppe wurden MPP3 und Nectin-1 in COS-7-Zellen koexprimiert. Die Verteilung der exprimierten Proteine in den Zellen wurde immunocytochemisch analysiert. Allein exprimiertes MPP3 zeigte eine cytosolische Verteilung, doch koexprimiertes Nectin-1 dirigierte MPP3 an Zell-Zell-Kontakte (Dudak et al. 2011). Um zu überprüfen, ob diese Interaktion auch in unserem System mit HEK293-Zellen zu beobachten ist, wurde CFP(int)-Nectin-1 (Konstrukt 6, siehe Abbildung 25) mit carboxyterminal markiertem MPP3-YFP kotransfiziert. Die Abfolge der Domänen von MPP3 ist in Abbildung 29 dargestellt. Im Rahmen der Klonierung von MPP3-YFP wurde MPP3 am Carboxyterminus in diesem Konstrukt um insgesamt 26 Aminosäuren gekürzt. Davon gehörten elf Aminosäuren zur nicht katalytisch aktiven Guanilat-Kinase-Domäne. Anders als bei Dudak et al. lag mit Nectin-1 koexprimiertes

MPP3-YFP in unserem Versuch nicht an Zell-Zell-Kontakte dirigiert vor, sondern wie ohne Kotransfektion cytosolisch (Abbildung 30, erste Reihe). In den Experimenten von Dudak et al. wurde MPP3 mit einem aminoterminalen flag-Tag markiert. Das von Dudak et al. verwendete Konstrukt wies also einen intakten Carboxyterminus auf. Wir vermuteten, dass die Veränderungen, die wir am Carboxyterminus durch die Fusion mit YFP vorgenommen hatten, eine Interaktion mit Nectin-1 verhindern. Um dies zu überprüfen, klonierten wir in einem zweiten Anlauf ein aminoterminal fluoreszenzmarkiertes MPP3-Konstrukt, das folglich einen intakten Carboxyterminus aufweist (siehe schematische Darstellung Abbildung 29). Tatsächlich ließ sich das aminoterminal markierte YFP-MPP3 durch die Kotransfektion von CFP(int)-Nectin-1 an Zell-Zell-Kontakte dirigieren (Abbildung 30, dritte Reihe). Dies ist zunächst verwunderlich, da die Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3 über die PDZ-Bindesequenz von Nectin-1 und die PDZ-Domäne von MPP3 beschrieben ist (Dudak et al. 2011). Diese PDZ-Domäne findet sich intakt sowohl in MPP3-YFP als auch in YFP-MPP3. Der Unterschied zwischen den MPP3-Konstrukten liegt in der Guanylat-Kinase-Domäne und dem Carboxyterminus, also einem Bereich, der zumindest in der linearen Proteinkette, wie sie in Abbildung 29 dargestellt ist, von der PDZ-Domäne entfernt liegt.

Es gibt zwei mögliche Gründe dafür, dass der Terminus, an dem MPP3 mit dem Fluoreszenzprotein fusioniert ist, eine Rolle für die Interaktion zu Nectin-1 spielt: Eine Möglichkeit ist, dass das 27 kDa große Fluoreszenzprotein bei MPP3-YFP sterisch die Interaktion zwischen PDZ-Bindemotiv und PDZ-Domäne hindert. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Aminosäuren, die im Rahmen der Klonierung entfernt worden sind, für die Interaktion notwendig waren. Um diese zweite Variante zu überprüfen, konstruierten wir die Deletionsmutante YFP-MPP3<sub>577stop</sub>. Sie endet nach dem Serin in Position 577. Es fehlen die letzten acht Aminosäuren. Die Guanylat-Kinase-Domäne liegt nach wie vor vollständig vor (siehe Abbildung 29). Wie in der vierten Reihe von Abbildung 30 zu erkennen ist, lässt sich YFP-MPP3<sub>577stop</sub> nicht mehr durch CFP(int)-Nectin-1 dirigieren. Dieser Befund spricht dafür, dass die letzten 8 Aminosäuren von MPP3, die hinter der Guanylat-Kinase-Domäne und somit entfernt von der PDZ-Domäne liegen, überraschenderweise für die Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3 wichtig sind.



**Abbildung 30: Abhängigkeit der Dirigierbarkeit von MPP3 durch Nectin-1 von Carboxyterminus und PDZ-Domäne von MPP3**

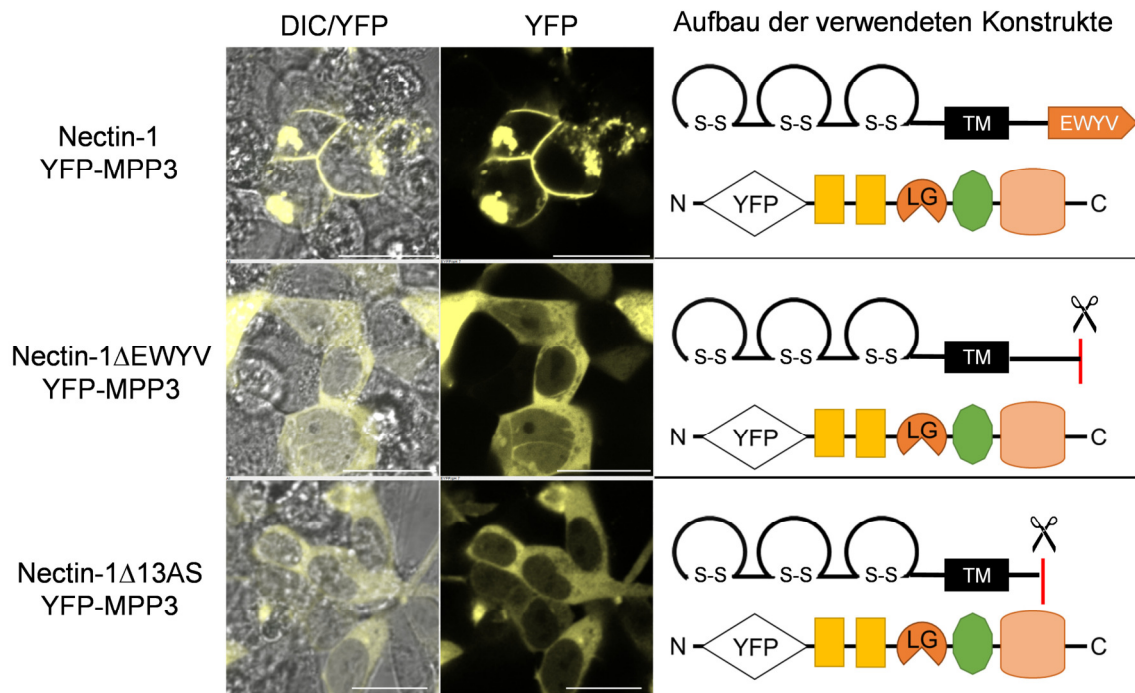
Nectin-1, das im extrazellulären Teil durch ein CFP markiert ist, wurde transient in HEK293-Zellen mit unterschiedlichen Konstrukten von MPP3 kotransfiziert. Dessen subzelluläre Lokalisation wurde im CLSM analysiert. Carboxyterminal markiertes MPP3 liegt unabhängig von einer Kotransfektion cytosolisch vor, aminoterminal markiertes MPP3 wird durch Nectin-1 an die Zellmembran dirigiert. Carboxyterminal deletiertes YFP-MPP3 und MPP3 mit zerstörter PDZ-Domäne sind trotz Kotransfektion mit Nectin-1 nicht an der Membran lokalisiert, sondern liegen cytosolisch vor. Abgebildet sind exemplarische Bildausschnitte. Balken entsprechen 20 µm. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Aufgrund der überraschenden Bedeutung des Carboxyterminus von MPP3 für die Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1 stellten wir die Hypothese auf, dass die Interaktion zwischen den beiden Proteinen nicht zwischen PDZ-Domäne und PDZ-Bindemotiv stattfindet, sondern unter Beteiligung des Carboxyterminus von MPP3 über andere Bereiche von Nectin-1. Auch in der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass der cytosolische, carboxyterminale Teil von Nectin-1 mit anderen Bereichen als dem PDZ-Bindemotiv an Proteininteraktionen beteiligt

ist: Die juxtamembranäre Domäne von Nectin-1 lenkt Willin, ein Protein, das beim Hippo-Signalweg eine Rolle spielt, an die Zell-Zell-Kontakte (Ishiuchi und Takeichi 2012). In Analogie dazu könnte die Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1 also möglicherweise über den juxtamembranären Bereich von Nectin-1 und den Carboxyterminus von MPP3 vermittelt werden. Um diese Hypothese zu prüfen, konstruierten wir ein MPP3-Konstrukt, bei dem die PDZ-Domäne nicht mehr bindungsfähig ist. In dem Konstrukt YFP-MPP3\_LG144/145AE sind zwei Aminosäuren ausgetauscht. PDZ-Domänen mit dieser Mutation können nicht mehr mit PDZ-Bindemotiven interagieren (Petit, M. M. R. et al. 2005). Eine Interaktion, die nicht über PDZ-Bindemotiv und PDZ-Domäne vermittelt wird, sollte mit diesem Konstrukt noch möglich sein. YFP-MPP3\_LG144/145AE lässt sich aber nicht mehr von CFP(int)-Nectin-1 an Zell-Zell-Kontakte dirigieren (Abbildung 30, fünfte Reihe). Für die Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3 ist folglich eine intakte PDZ-Domäne von MPP3 notwendig. Es sind demnach für die Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3 sowohl eine intakte PDZ-Domäne von MPP3 als auch die carboxy-terminal letzten acht Aminosäuren von MPP3 notwendig.

Nachdem verschiedene Varianten von MPP3 getestet wurden, sollte in einem weiteren Versuch überprüft werden, inwieweit sich Modifikationen von Nectin-1 auf die Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1 auswirken (Abbildung 31). Dafür wurde der Carboxyterminus von Nectin-1 deletiert: Dem Konstrukt Nectin-1ΔEWYV fehlt das PDZ-Bindemotiv. In einem weiteren Konstrukt führten wir ein Stoppcodon an Position 505 ein. Dies führt zu der Bildung eines Nectin-1, dem die letzten 13 Aminosäuren fehlen. Die oben beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1 über die PDZ-Domäne von MPP3 vermittelt ist. Darum erwarteten wir, dass auch bei der Deletion des PDZ-Bindemotivs von Nectin-1 keine Interaktion mehr möglich ist. Die Ergebnisse bestätigen unsere Vermutung. Vollständiges Nectin-1 dirigiert MPP3 zu Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 31, erste Reihe). Beide carboxyterminal deletierten Nectin-Konstrukte sind nicht mehr in der Lage, YFP-MPP3 zum Zell-Zell-Kontakt zu dirigieren, und YFP-MPP3 liegt daher cytosolisch vor (Abbildung 30, zweite und dritte Reihe).





**Abbildung 31: Abhängigkeit der Dirigierbarkeit von MPP3 durch Nectin-1 von einem intakten PDZ-Bindemotiv von Nectin-1**

YFP-MPP3 wurde mit vollständigem Nectin-1 oder carboxyterminal deletierten Konstrukten transient in HEK293-Zellen kotransfiziert. Die subzelluläre Lokalisation von YFP-MPP3 wurde im CLSM analysiert. Kotransfektion von vollständigem Nectin-1 führt zum Dirigat von YFP-MPP3 an Zell-Zell-Kontakte. Die Deletion der letzten vier Aminosäuren beziehungsweise der letzten 13 Aminosäuren von Nectin-1 verhindern diese Interaktion. Abgebildet sind exemplarische Bildausschnitte. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

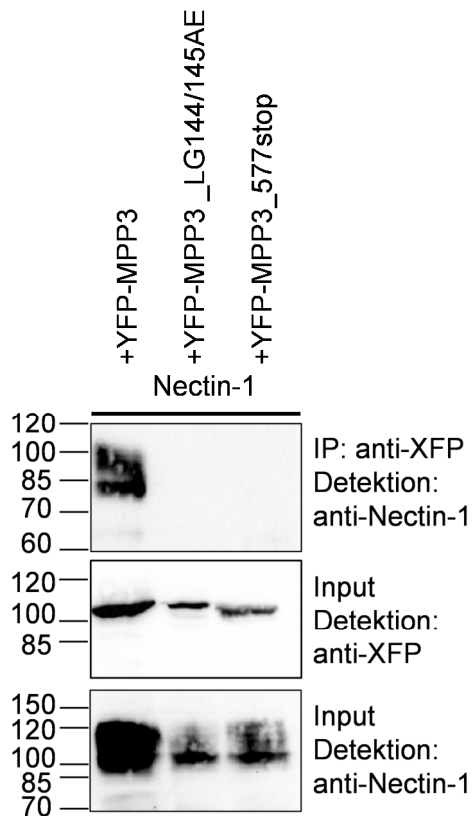
Diese Ergebnisse bestätigen, dass Nectin-1 und MPP3 primär über PDZ-Domäne und PDZ-Bindemotiv miteinander interagieren. Sowohl die PDZ-Domäne von MPP3 als auch das PDZ-Bindemotiv von Nectin-1 sind für die Interaktion zwischen den beiden Proteinen erforderlich.

#### 4.4.2 Immunopräzipitation von Nectin-1 mit YFP-MPP3

Die zellbiologischen Untersuchungen (siehe Kapitel 4.4.1) deuten darauf hin, dass für eine funktionelle Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3 die intakte PDZ-Bindesequenz von Nectin-1 sowie die intakte PDZ-Domäne von MPP3 notwendig sind. Darüber hinaus hatte sich auch überraschend ergeben, dass der neben der Guanylat-Kinase-Domäne liegende carboxyterminale Bereich von MPP3 entscheidend für diese Interaktion ist. Bei diesen zellbiologischen Untersuchungen hatten wir eine funktionelle Interaktion geprüft, nämlich die Fähigkeit von Nectin-1, MPP3 an Zell-Zell-Kontakte zu dirigieren. Um zu überprüfen, ob die identifizierten Sequenzmotive auch für eine physische Interaktion der beiden Bindungspartner entscheidend sind, führten wir Immunopräzipitationen durch.

Zunächst wurde Nectin-1 mit fluoreszenzproteinmarkiertem MPP3 und zwei mutierten YFP-MPP3-Konstrukten in HEK293-Zellen kotransfiziert. Bei YFP-MPP3<sub>LG144/145AE</sub> ist die PDZ-Domäne nicht mehr bindungsfähig. YFP-MPP3<sub>577stop</sub> ist am Carboxyterminus um acht Aminosäuren verkürzt. Mit den Membranfraktionen der kotransfizierten HEK293-Zellen wurde eine Immunopräzipitation mit einem gegen das Fluoreszenzprotein gerichteten Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Nectin-1 ist in dem Präzipitat von YFP-MPP3 bei 80-105 kDa nachweisbar (oberer Blot, erste Spalte). In den Präzipitaten der anderen beiden MPP3-Konstrukte ist kein Nectin-1 nachweisbar (oberer Blot, Spalten 2 und 3). Die unteren Blots zeigen das Vorkommen der entsprechenden Konstrukte in den zur Immunopräzipitation eingesetzten Membranfraktionen.

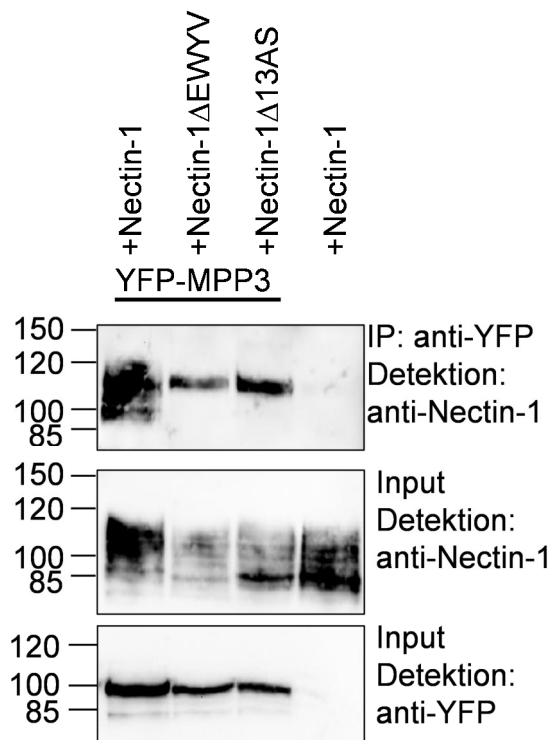
Nach Herstellung einer Membranfraktion findet sich deutlich mehr Nectin-1 in der Koexpression mit intaktem MPP3 gegenüber den Koexpressionen mit mutierten MPP3-Varianten (Abbildung 32, dritter Blot). Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion mit intaktem MPP3 zu einer Stabilisierung von Nectin-1 führt. Alternativ könnte dies auf unspezifische toxische Effekte der MPP3-Mutanten zurückzuführen sein, die die Fähigkeit der Zellen zur Proteinbiosynthese hemmen. Die leicht höhere Expression von MPP3 in der Membranfraktion gegenüber den MPP3-Mutanten könnte daran liegen, dass sich die MPP3-Mutanten ohne funktionelle Interaktion mit Nectin-1 vor allem im Cytosol und damit nicht in der Membranfraktion finden (siehe Abbildung 30). Die Befunde sprechen dafür, dass analog zu der funktionellen Interaktion auch für eine physische Interaktion sowohl die PDZ-Domäne als auch der carboxyterminale Bereich von MPP3 entscheidend sind.



**Abbildung 32: Interaktion zwischen Nectin-1 und Varianten von YFP-MPP3**

Immunopräzipitation mit der Membranfraktion aus HEK293-Zellen, die Nectin-1 und vollständiges YFP-MPP3, YFP-MPP3 mit funktionsunfähiger PDZ-Domäne (YFP-MPP3\_LG144/145AE) oder YFP-MPP3 mit deletiertem Carboxyterminus (YFP-MPP3\_577stop) exprimierten. Präzipitate mit gegen das Fluoreszenzprotein YFP gerichtetem Antikörper wurden mit spezifischem Antikörper gegen Nectin-1 im Westernblot analysiert. Zur IP eingesetzte Membranfraktionen wurden im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen Nectin-1 und gegen YFP analysiert. Abgebildet sind exemplarisch die Westernblots eines Versuchs. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

In einer zweiten Immunopräzipitation wurde die Bedeutung des PDZ-Bindemotivs von Nectin-1 für die Interaktion von Nectin-1 zu YFP-MPP3 untersucht (Abbildung 33). Dafür wurde YFP-MPP3 mit am Carboxyterminus um vier oder 13 Aminosäuren deletiertem Nectin-1 kotransfiziert und mit einem Antikörper gegen das Fluoreszenzprotein präzipitiert. Als Positivkontrolle wurde vollständiges Nectin-1 mit YFP-MPP3 kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde Nectin-1 ohne YFP-MPP3 transfiziert und mit dem Antikörper gegen das Fluoreszenzprotein präzipitiert. Vollständiges Nectin-1 ist in dem Präzipitat von YFP-MPP3 wie in dem vorherigen Versuch nachweisbar (oberer Blot, erste Spalte). Doch auch Nectin-1ΔEWYV und Nectin-1Δ13AS lassen sich in den YFP-MPP3-Präzipitaten der Membranfraktionen nachweisen (oberer Blot, Spalten 2 und 3). Die Banden sind schwächer als die der Positivkontrolle. In der Negativkontrolle ist wie zu erwarten kein Nectin-1 detektierbar. Analog zu dem vorherigen Versuch (Abbildung 32) findet sich bei der Koexpression von intaktem Nectin-1 und intaktem MPP3 wieder die stärkste Expression der Einzelproteine.



**Abbildung 33: Interaktion zwischen Varianten von Nectin-1 mit YFP-MPP3**

Immunopräzipitation mit der Membranfraktion aus HEK293-Zellen, die YFP-MPP3 und vollständiges Nectin-1, Nectin-1 ohne PDZ-Bindemotiv (Nectin-1ΔEWYV) oder Nectin-1, dem 13 Aminosäuren am Carboxyterminus fehlen (Nectin-1Δ13AS), exprimierten. Als Negativkontrolle diente Membranfraktion aus HEK293-Zellen, die vollständiges Nectin-1 und kein fluoreszenzproteinmarkiertes Protein exprimierten. Präzipitate mit gegen das Fluoreszenzprotein YFP gerichtetem Antikörper wurden mit spezifischem Antikörper gegen Nectin-1 im Westernblot analysiert. Zur IP eingesetzte Membranfraktionen wurden im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen Nectin-1 und gegen YFP analysiert. Abgebildet sind exemplarisch die Westernblots eines Versuchs. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Die Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3 konnte über die Immunopräzipitationsexperimente bestätigt werden. Die Deletion des Carboxyterminus oder die Zerstörung der PDZ-Domäne von MPP3 verhindern die Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3. Überraschenderweise verhindert die Deletion des PDZ-Bindemotivs von Nectin-1 die Interaktion mit YFP-MPP3 nicht vollständig.

#### 4.4.3 *Beeinflussung der Lokalisation von Lin7a und $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ durch MPP3 und Nectin-1*

Wir konnten in Kapitel 4.2 bereits zeigen, dass Lin7a mit der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  interagiert. Außerdem gibt es sowohl in der Literatur als auch in unseren Ergebnissen Hinweise auf Interaktionen zwischen MPP3 und Lin7a (Kamberov et al. 2000), zwischen MPP3 und Nectin-1 (Dudak et al. 2011) und zwischen Nectin-1 und Lin7a (Yamamoto et al. 2002). Darüber hinaus identifizierten wir MPP3 als wahrscheinlichen indirekten Interaktionspartner der NOsGC Iso-form  $\alpha_2\beta_1$  und charakterisierten die Zell-Zell-Kontakte, an denen  $\alpha_2\beta_1$  lokalisiert ist, als calciumunabhängig und vermutlich aus Nectinen aufgebaut. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse stellten wir die Hypothese auf, dass die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  über Lin7a und MPP3 an Nectin-1 bindet und so die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  zustande kommt.

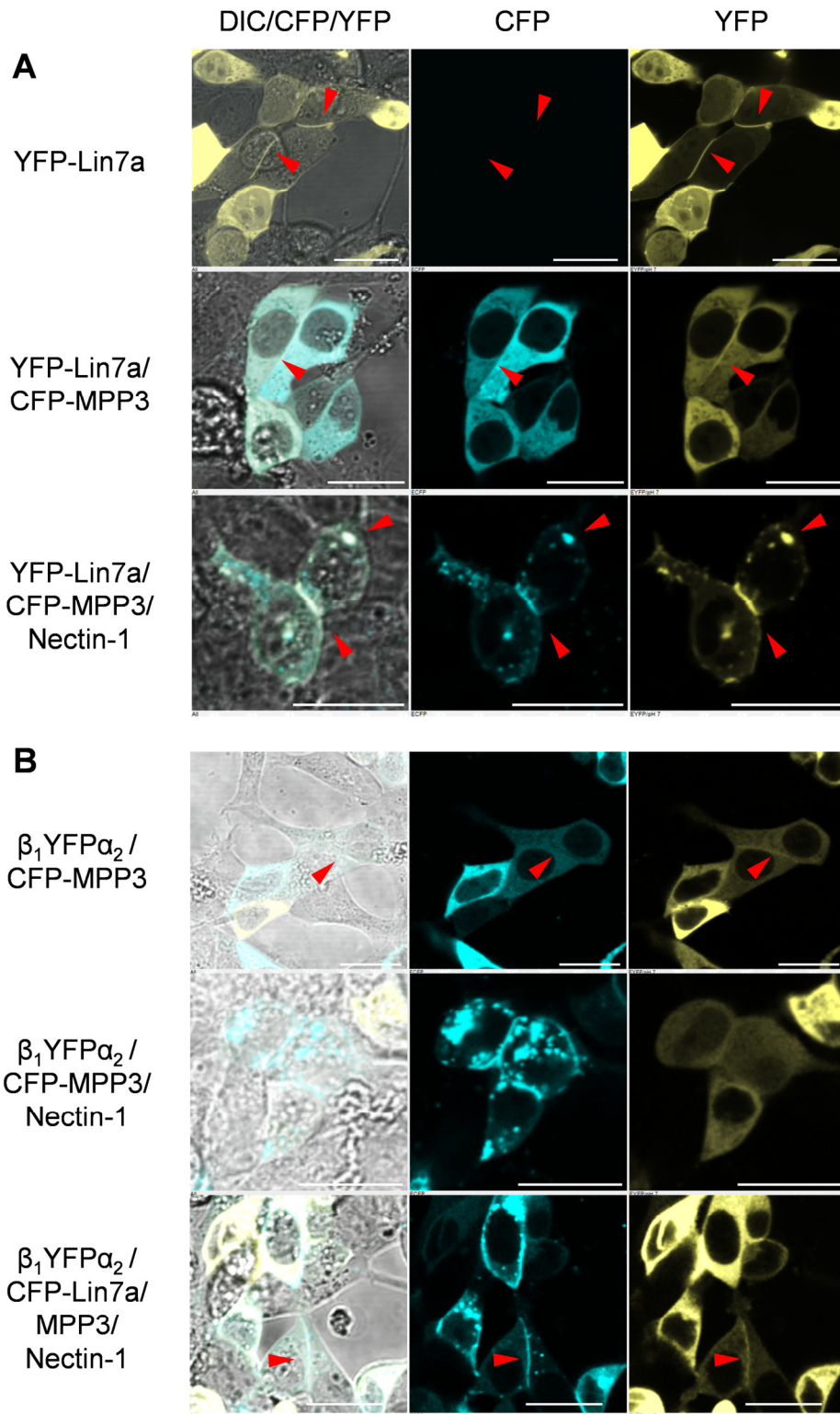
Nectin-1 lenkt das in HEK293-Zellen zuvor cytosolisch vorliegende MPP3 an Zell-Zell-Kontakte (Dudak et al. 2011). Wir vermuteten, dass dieses Dirigieren zum Zell-Zell-Kontakt auch mikroskopisch zu erkennen ist, wenn neben Nectin-1 und MPP3 auch Lin7a oder  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  in HEK293-Zellen kotransfiziert werden. Wir transfizierten die am Komplex potenziell beteiligten Proteine in unterschiedlichen Kombinationen in HEK293-Zellen, um herauszufinden, inwieweit sie sich gegenseitig in ihrer Lokalisation beeinflussen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt. Allein transfiziertes Lin7a liegt wie oben beschrieben am Zell-Zell-Kontakt lokalisiert vor (Abbildung 34A, obere Zeile, rote Pfeile). Neben der stärkeren Fluoreszenz am Zell-Zell-Kontakt liegt das Protein gelöst und gleichmäßig in der Zelle verteilt vor. Auch im Zellkernbereich ist Fluoreszenz vorhanden. CFP-MPP3 liegt gleichmäßig verteilt im Cytosol der Zellen vor (Abbildung 34A, zweite Zeile). In den Zellkernbereichen und an Zell-Zell-Kontakten ist keine Fluoreszenz im CFP-Kanal auszumachen. Die Kotransfektion von YFP-Lin7a und CFP-MPP3 führt dazu, dass auch im YFP-Kanal kein Signal in den Zellkernbereichen zu erkennen ist. An einigen Stellen ist auch bei der Kotransfektion von YFP-Lin7a und CFP-MPP3 eine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von YFP-Lin7a auszumachen, doch die Kontakte sind weniger gut zu erkennen als bei allein transfiziertem YFP-Lin7a. In der dritten Reihe von Abbildung 34A sind YFP-Lin7a und CFP-MPP3 mit Nectin-1 kotransfiziert. Nectin-1 ist nicht mit einem Fluoreszenzprotein markiert und darum nicht direkt im CLSM zu sehen, allerdings ist das oben beschriebene Dirigieren von CFP-MPP3 eindeutig zu erkennen und kann als Transfektionskontrolle für Nectin-1 gelten. Die Kotransfektion von Nectin-1 bewirkt wie oben beschrieben eine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von CFP-MPP3. Interessanterweise ist auch YFP-Lin7a durch die Kotransfektion von Nectin-1 deutlich beeinflusst. Die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation ist deutlich ausge-

prägender als ohne Kotransfektion von CFP-MPP3 und Nectin-1. Des Weiteren fehlt die cytosolische, gleichmäßige Verteilung des YFP-Signals, vielmehr scheinen CFP-MPP3 und YFP-Lin7a durch Nectin-1 an Zell-Zell-Kontakte kolokalisiert zu werden (Abbildung 34, dritte Reihe, rote Pfeile).

In Abbildung 34 B ist die Kotransfektion der Proteine Lin7a, MPP3 und Nectin-1 mit dem NOsGC-Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  dargestellt. Die erste Reihe von Abbildung 34B zeigt die Lokalisation von kotransfiziertem  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  und CFP-MPP3. Die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ist schwächer zu erkennen als bei allein transfiziertem  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ , es ist allerdings noch eine Lokalisation am Zell-Zell-Kontakt auszumachen (roter Pfeil). CFP-MPP3 liegt cytosolisch in den Zellen vor. Durch die Kotransfektion von Nectin-1 wird CFP-MPP3 auch in Anwesenheit von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zu Zell-Zell-Kontakten dirigiert. Die Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ist durch die veränderte Lokalisation von CFP-MPP3 allerdings nicht beeinflusst. In einem weiteren Ansatz wurde  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  auch mit CFP-Lin7a, MPP3 und Nectin-1 kotransfiziert (Abbildung 34B, dritte Zeile). Doch auch in diesem Versuch wurde auf die subzelluläre Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  kein Einfluss genommen. An einigen Zell-Zell-Kontakten kolokalisiert das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  mit CFP-Lin7a (roter Pfeil). Diese Kolokalisation tritt allerdings nur vereinzelt auf und ist in ihrer Intensität nicht mit der Kolokalisation zwischen dirigiertem CFP-MPP3 und YFP-Lin7a (Abbildung 34A) vergleichbar.

Die Lokalisation von YFP-Lin7a ist stark durch die Kotransfektion von CFP-MPP3 und Nectin-1 beeinflusst. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die drei transfizierten Proteine als ternärer Komplex an den Zell-Zell-Kontakten der HEK293-Zellen vorliegen. Die Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ließ sich durch die Kotransfektion von CFP-MPP3 und Nectin-1 oder von CFP-Lin7a, MPP3 und Nectin-1 nicht beeinflussen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Lin7a, CFP-MPP3 und Nectin-1 aneinander gebunden am Zell-Zell-Kontakt vorliegen, dass  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  aber nicht mit diesem Komplex interagiert.



**Abbildung 34: Einfluss der Kotretransfektion von MPP3 und Nectin-1 auf die Lokalisation von Lin7a und  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$**

A: YFP-Lin7a wurde entweder allein (erste Reihe), zusammen mit CFP-MPP3 (zweite Reihe) oder zusammen mit CFP-MPP3 und Nectin-1 (dritte Reihe) transient in HEK293-Zellen transfiziert. Pfeile zeigen auf Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von YFP-Lin7a. B:  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  wurde zusammen mit CFP-MPP3 (erste Reihe), zusammen mit CFP-MPP3 und Nectin-1 (zweite Reihe) oder mit CFP-Lin7a, MPP3 und Nectin-1 transient in HEK293-Zellen transfiziert (dritte Reihe). Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. Balken entsprechen 20  $\mu$ m.



## 5 Diskussion

Es gibt ein großes Netzwerk von Signalwegen, die hauptsächlich durch den Botenstoff cGMP vermittelt werden, und eine Vielzahl an Zellereignissen, die dadurch gesteuert werden (vgl. Kapitel 1.1.3). Die korrekte Signalweiterleitung ist daher von einer Kompartimentierung des Botenstoffs abhängig (Buxton und Brunton 1983; Arora et al. 2013). Die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  ist an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (Haase 2010) und so in der Lage, ein membrannahes cGMP-Kompartiment zu bilden (Bellingham und Evans 2007). Die hier beschriebenen Untersuchungen erweitern das Verständnis für die zellulären Begebenheiten, die eine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  bewirken.

### 5.1 Beeinflussung der Lokalisation der NOsGC durch Phosphorylierung

#### 5.1.1 Phosphorylierung durch die Src-Kinase FYN

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  in HEK293-Zellen abnimmt, wenn die Phosphorylierung der  $\beta_1$ -Untereinheit an dem Tyrosin in Position 192 durch eine Punktmutation verhindert ist. Dabei ist die Phosphorylierung der  $\beta_1$ -Untereinheit keine notwendige Bedingung für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$ , denn auch das nicht phosphorylierbare Heterodimer liegt noch an Zell-Zell-Kontakten vor. Der Effekt dieser Punktmutation an Position 192 der  $\beta_1$ -Untereinheit ist bei den gemeinsam transfizierten Untereinheiten YFP $\alpha_2$  und  $\beta_1$ CFP und dem erzwungenen Heterodimer  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  vergleichbar groß. Daraus lässt sich schließen, dass der Grund für eine geringere Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der nicht phosphorylierbaren Konstrukte nicht eine verminderte Heterodimerisierung der Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\alpha_2$  ist.

Das Tyrosin 192 der  $\beta_1$ -Untereinheit liegt in dem Bereich zwischen H-NOX-Domäne und PAS-Domäne (Abbildung 35, Montfort et al. 2017). In Interneuronen der Kleinhirnrinde wird die  $\beta_1$ -Untereinheit von der Src-Kinase FYN an Position 192 phosphoryliert (Cioni et al. 2013; Meurer et al. 2005). Die Phosphorylierung führt zu der Ausbildung einer SH2-Domäne, über die die  $\beta_1$ -Untereinheit auch nach der FYN-vermittelten Phosphorylierung weiter mit FYN interagiert. FYN ist myristoyliert und dadurch an die Plasmamembran gelenkt (Resh 1998). Durch die Interaktion mit dem membranassoziierten FYN ist auch die NOsGC an der Plasmamembran lokalisiert und bildet so einen kompartimentierten, membrannahen cGMP-Pool, der die Bildung axonaler Verzweigungen der Korbzellen in der Purkinjezellschicht unterstützt (Cioni et al. 2013).





ren Stellen phosphoryliert, die von Meurer et al. nicht weiter spezifiziert werden. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit hingegen unterliegt keinen posttranslationalen Phosphorylierungen (Meurer et al. 2005). Die  $\alpha_2$ -Untereinheit wurde von der Arbeitsgruppe nicht untersucht. Eine Analyse mit dem Onlinetool Disphos<sup>®</sup> (Iakoucheva et al. 2004) ergibt, dass eine Phosphorylierung der Tyrosine in Position 18, 495 und 664 innerhalb der  $\alpha_2$ -Untereinheit wahrscheinlich ist. Ob diese Phosphorylierungen tatsächlich von der Src-Kinase FYN durchgeführt werden und ob zwischen der Phosphorylierung dieser Tyrosine und der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  ein Zusammenhang besteht, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Es ist möglich, dass die Src-Kinase, die an die SH2-Domäne der  $\beta_1$ -Untereinheit bindet, nicht nur die NOsGC selbst, sondern auch Proteine in der direkten Nachbarschaft der NOsGC phosphoryliert. Für solch eine Phosphorylierung kommen auch Proteine infrage, die die NOsGC über das PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit binden und so in die direkte Nähe der Src-Kinase kommen. In diesem Fall käme der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  die Rolle eines Adapterproteins zu.

#### 5.1.2 Phosphorylierung der $\alpha_2$ -Untereinheit

Wie in Tabelle 1 dargestellt bildet die PDZ-Erkennungssequenz der  $\alpha_2$ -Untereinheit, bestehend aus den Aminosäuren FLRETSL (Position 724-730), auch eine Erkennungssequenz für die CamKII (White et al. 1998). Dabei ist das Serin in Position 729 potenzielles Ziel einer Phosphorylierung durch die CamKII. Eine Phosphorylierung innerhalb einer PDZ-Erkennungssequenz kann die Bindungseigenschaften an entsprechende PDZ-Domänen beeinflussen (Pangon et al. 2012; Cohen et al. 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer möglichen Phosphorylierung der CAMKII auf die PDZ-vermittelte Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Fusionskonstruktes  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  untersucht. Dafür wurde das Fusionskonstrukt in Position 729 der  $\alpha_2$ -Untereinheit zum nicht mehr phosphorylierbaren Alanin bzw. zur phosphomimetischen Asparaginsäure mutiert (grün und rot markiert in Tabelle 1).

**Tabelle 1: Carboxyterminus der  $\alpha_2$ -Untereinheit im Vergleich mit der Erkennungssequenz der CaMKII**

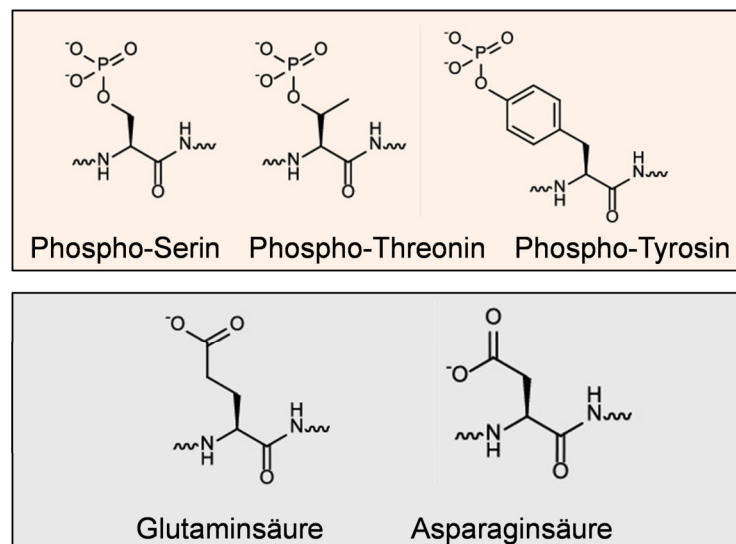
Der rote Kreis markiert die phosphomimetische Asparaginsäure, der grüne Kreis markiert das nicht phosphorylierbare Alanin. Innerhalb der Erkennungssequenz der CaMKII steht  $\Phi$  für eine hydrophobe Aminosäure, der Pfeil markiert die Position, an der die CaMKII eine Phosphorylierung durchführt.

Erkennungssequenz CamKII	$\Phi$	X	R	X	X	S/T	
Carboxyterminus $\alpha_2$	F	L	R	E	T	S	L Zell-Zell Kontakte
nicht phosphorylierbare Mutante	F	L	R	E	T	A	L weniger Zell-Zell-Kontakte
Phosphomimese	F	L	R	E	T	D	L keine Zell-Zell Kontakte
Position/Nummerierung	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
	724	725	726	727	728	729	730

In vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe zu dieser Fragestellung wurde die  $\beta_1$ -Untereinheit mit entsprechend mutierten  $\alpha_2$ -Untereinheiten kotransfiziert. Bei der damaligen Vorgehensweise waren sowohl für das phosphomimetische als auch für das nicht mehr phosphorylierbare  $\alpha_2$ -Konstrukt ein starker Rückgang der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation zu beobachten (Busker 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die vorherigen Ergebnisse dahingehend, dass die mutierten Konstrukte wieder weniger an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert waren als der Wildtyp. Durch die insgesamt deutlichere und häufigere Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Fusionskonstruktes  $\beta_1$ YFP $\alpha_2$  im Vergleich zu den einzeln transfizierten NOsGC-Untereinheiten  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  machen die Untersuchungen in dieser Arbeit aber eine differenziertere Analyse möglich. Während das Konstrukt, das sich nicht mehr phosphorylieren lässt, noch an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist, zeigt die phosphomimetische Variante keine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation. Die Ergebnisse sprechen dagegen, dass eine Phosphorylierung in Position 729 die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation begünstigt. Im Gegenteil lässt der deutlich stärkere negative Effekt der phosphomimetischen Mutation vermuten, dass die Isoform  $\alpha_2\beta_1$  durch eine Phosphorylierung der  $\alpha_2$ -Untereinheit in Position 729 weg von Zell-Zell-Kontakten hin zu einer anderen Zielstruktur dirigiert werden könnte.

Relativ nah an dem PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit befindet sich eine hoch konservierte Erkennungssequenz für die Proteinkinasen A und G (Busker 2013; Kennelly und Krebs 1991). Dabei ist das Serin in Position 717 potenzielles Ziel einer Phosphorylierung durch diese Kinasen. Um einen möglichen Einfluss der Phosphorylierung in Position 717 auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC zu untersuchen, wurde eine phosphomimetische Mutation zur Glutaminsäure durchgeführt. Die Mutation führte zu einem Rückgang der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$  (Busker 2013). Eine Mutation zur Glutaminsäure stellt zwar eine einfache Möglichkeit dar, die Phosphorylierung eines Serins zu imitieren, doch tatsäch-

lich weichen die Bindungseigenschaften einer Glutaminsäure von denen eines Phospho-Serin deutlich ab (Abbildung 36, Zhu et al. 2011; Pedersen et al. 2017). Die Internetseite Phosphosite® Plus gibt Auskunft über *in-vivo*-Phosphorylierungen im Proteom von Mensch, Maus und Ratte (Hornbeck et al. 2015). Für das Serin 717 in der  $\alpha_2$ -Untereinheit wird dort vorhergesagt, dass es in über 75% der Fälle phosphoryliert vorliegt (Mertins et al. 2016). Unter Einbezug dieser Informationen lassen die Ergebnisse von Busker vermuten, dass ein im Wildtyp vorkommendes Phospho-Serin 717 an der Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$  beteiligt ist und dieses Phospho-Serin der phosphomimetischen Glutaminsäure in den Bindungseigenschaften, die zur Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation führen, überlegen ist. Inwieweit das Serin in Position 717 an der Rekrutierung der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  beteiligt ist und so zur dynamischen Regulation beiträgt, müssen weitere Untersuchungen klären. Dabei ist es notwendig, einen anderen Ansatz zu wählen als die phosphomimetische Mutagenese zur Glutaminsäure. Eine Möglichkeit besteht darin, die Proteinkinase spezifisch zu hemmen oder ihre Aktivität zum Beispiel durch Überexpression zu steigern. Dies ist ein relativ unspezifischer Ansatz, der über die Position, in der eine Phosphorylierung stattfindet, keine Aussage zulässt. Um abzuklären, ob die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$ , die am Zell-Zell-Kontakt lokalisiert ist, an Position 717 phosphoryliert ist, ist es auch denkbar, einen Antikörper gegen phosphoryliertes S717 zu generieren (vgl. Meurer et al. 2005). Nach immunohistochemischem Nachweis ließe sich damit die Lokalisation von phosphoryliertem  $\alpha_2\beta_1$  feststellen.

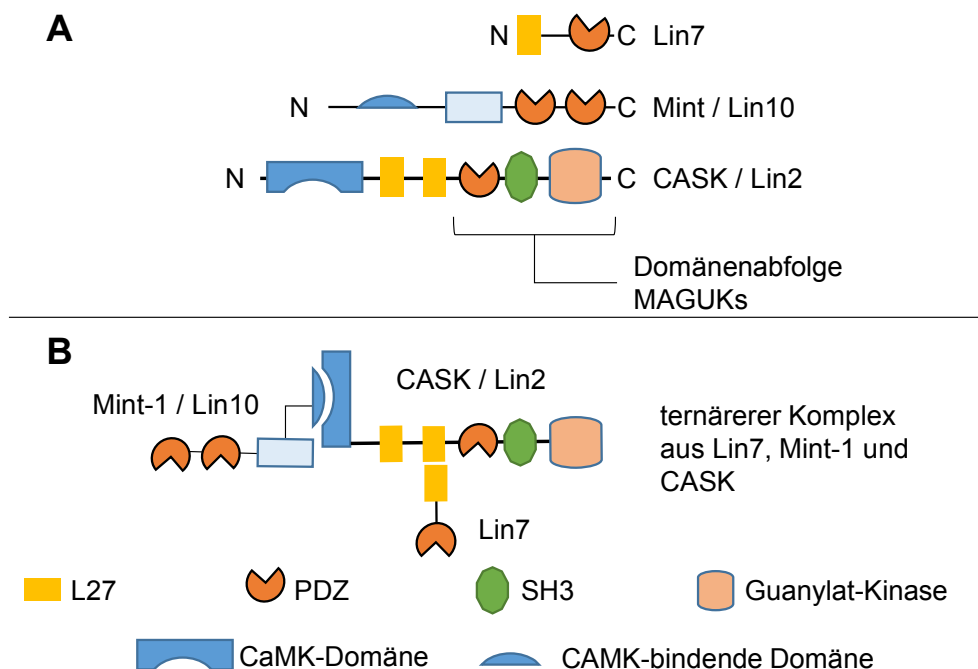


**Abbildung 36: Vergleich phosphorylierter Aminosäuren mit phosphomimetisch eingesetzten Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure**

Nach Pedersen et al. (2017). Die Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure weisen im physiologischen Milieu zwar eine negative Ladung auf, unterscheiden sich abgesehen davon aber deutlich von den phosphorylierten Aminosäuren Phospho-Serin, Phospho-Threonin und Phospho-Tyrosin.

## 5.2 Lin7a als direkter Interaktionspartner der NOsGC

In *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) bindet Lin7 über die PDZ-Domäne an die Rezeptor-Tyrosinkinase LET-23 und ist zusammen mit Lin2 und Lin10 für die Lokalisation dieses Rezeptors an der basolateralen Membran der Epithelzelle verantwortlich (Simske et al. 1996; Kaech et al. 1998). Im Gehirn von Wirbeltieren existiert ein homologer ternärer Komplex: Lin7 ist zusammen mit Mint-1 (homolog zu Lin10) und CASK (homolog zu Lin2) Teil eines Proteinkomplexes, der synaptische Vesikel und deren Exozytose an neuronale Zell-Zell-Verbindungen dirigiert (Abbildung 37, Butz et al. 1998). CASK gehört zur Familie der MAGUK-Proteine, in die auch das bereits erwähnte Gerüstprotein PSD-95 einzuordnen ist. MAGUKs sind Gerüstproteine, die an unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Zell-Zell-Kommunikation, Zell-Polarität und Signaltransduktion beteiligt sind (Funke et al. 2005). Das gemeinsame Merkmal der MAGUKs ist eine Domänenabfolge von PDZ-Domäne, SH3-Domäne und enzymatisch inaktiver Guanylat-Kinase-Domäne (Abbildung 37 A, Funke et al. 2005). Bei dem ternären Komplex aus Mint, CASK und Lin7 bindet die L27-Domäne von Lin7 an die L27-Domäne von CASK. Tatsächlich sind L27-Domänen nach der Interaktion zwischen Lin2, dem *C. elegans*-Homolog von CASK, und Lin7 benannt (Doerks et al. 2000).



**Abbildung 37: Schematische Abbildung der Proteine Lin7, Mint-1 (Lin10) und CASK (Lin2)**

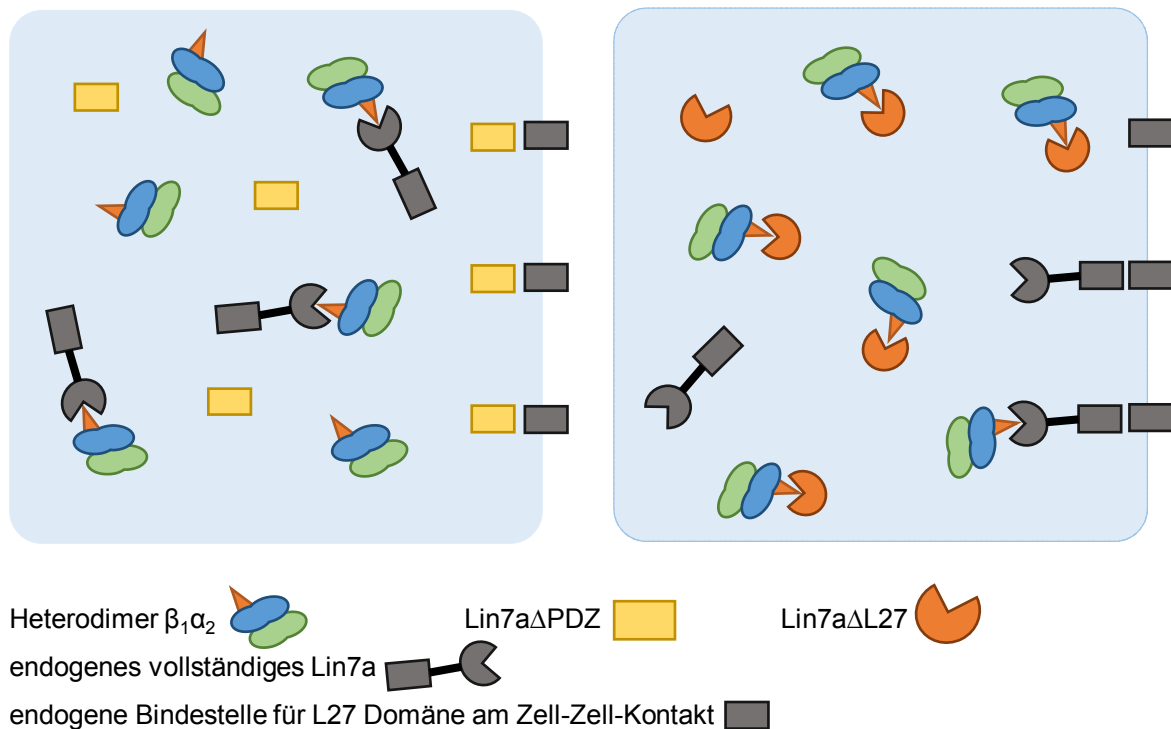
A: Domänenabfolge der Proteine Lin7, Mint-1 und CASK. MAGUKs weisen die Domänenabfolge PDZ-Domäne-SH3-Domäne und Guanylat-Kinase-Domäne auf. B: ternärer Komplex aus Mint-1, CASK und Lin7. Mint-1 interagiert über die CAMK-bindende Domäne mit der CAMK-Domäne von CASK. Lin7 bindet über die L27-Domäne an die carboxyterminale L27-Domäne von CASK.

Lin7a weist eine PDZ-Domäne auf, die spezifisch mit dem PDZ-Bindemotiv –RETSL interagiert (Stiffler et al. 2007). Darüber hinaus wurde Lin7a in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe über Affinitätschromatographie mit dem PDZ-Bindemotiv -RETSL und anschließende Massenspektrometrie als potenzieller Interaktionspartner der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC identifiziert (Hochheiser et al. 2016). Auf Grundlage dieser Hinweise auf eine Interaktion zwischen der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  und dem Adapterprotein Lin7a wurde das Proteinpaar mittels Immunopräzipitationsanalyse und CLSM untersucht. Dabei wurde Lin7a mit dem etablierten Interaktionspartner PSD-95 (Russwurm/Wittau/Koesling 2001) und dem ebenfalls mit  $\alpha_2\beta_1$  interagierenden Scribble (Ivarsson et al. 2014) verglichen. In der Immunopräzipitationsanalyse ließ sich in Übereinstimmung mit Russwurm et al. und Ivarsson et al. eine Interaktion zwischen  $\alpha_2$ -Untereinheit und PSD-95 bzw. zwischen  $\alpha_2$ -Untereinheit und Scribble nachweisen. Auch zwischen Lin7a und der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC ließ sich eine Interaktion nachweisen. Die Daten unterstützen unsere Hypothese, dass Lin7a mit der  $\alpha_2$ -Untereinheit interagiert. Überraschenderweise führt eine Mutation, die die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  vollständig verhindert, nicht dazu, dass die über Immunopräzipitation nachgewiesene Interaktion mit den PDZ-Proteinen Scribble, PSD-95 und Lin7a unterbleibt. Die Lokalisation am Zell-Zell-Kontakt ist folglich empfindlicher gegenüber Veränderungen in der PDZ-Erkennungssequenz als die über Immunopräzipitation nachgewiesene physische Interaktion zu den PDZ-Proteinen PSD-95, Scribble und Lin7a. Die Ergebnisse ließen sich dadurch erklären, dass ein anderes PDZ-Protein für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  verantwortlich ist und auf Veränderungen im PDZ-Bindemotiv empfindlicher reagiert als die untersuchten Proteine Lin7a, Scribble und PSD-95. Eine andere mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus Immunopräzipitation und mikroskopischer Analyse ist, dass neben der PDZ-Erkennungssequenz ein weiterer Bereich der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  an der Interaktion zu Lin7a, PSD-95 oder Scribble beteiligt ist. Diese andersartige Interaktion scheint von der Mutation in der PDZ-Erkennungssequenz nicht beeinträchtigt zu sein, allerdings für eine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation nicht auszureichen.

Im CLSM zeigt sich nach transienter Transfektion der drei Interaktionspartner von  $\alpha_2\beta_1$  in HEK293-Zellen, dass Lin7a an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert und damit in der subzellulären Lokalisation dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  gleicht. PSD-95 und Scribble zeigen abweichend dazu eine cytosolische bzw. eine membranäre Zell-Zell-Kontakt-unabhängige Lokalisation. Von den drei Interaktionspartnern Lin7a, Scribble und PSD-95 ist es folglich für Lin7a am

wahrscheinlichsten, dass es die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  vermittelt.

Lin7a-Konstrukte, denen eine der beiden Domänen fehlt, verdrängen  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  von den Zell-Zell-Kontakten. Dabei ist der Effekt der einzelnen L27-Domäne (Lin7a $\Delta$ PDZ) größer als die Auswirkung einer Kotransfektion der einzelnen PDZ-Domäne (Lin7a $\Delta$ L27). Abbildung 38 veranschaulicht diesen Effekt. Von überexprimierten Proteinen sind in den Zellen deutlich größere Mengen vorhanden als von endogenem Protein. In dem Modell liegen endogene Bindestellen für die L27-Domäne von Lin7a am Zell-Zell-Kontakt vor. Endogenes vollständiges Lin7a ist entsprechend unserer Hypothese in der Lage,  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an Zell-Zell-Kontakte zu dirigieren. Das überexprimierte Konstrukt Lin7a $\Delta$ PDZ besteht aus der L27-Domäne von Lin7a. Es interagiert mit den endogenen Bindestellen am Zell-Zell-Kontakt. Weil es von diesen endogenen Bindestellen weniger gibt als von dem überexprimierten Konstrukt Lin7a $\Delta$ PDZ (Abbildung 38, linkes Schema), sind sie vollständig von der Deletionsmutante besetzt und es kommt zu keiner Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ . Das Konstrukt Lin7a $\Delta$ L27 besteht aus der einzelnen PDZ-Domäne von Lin7a. Es interagiert mit dem PDZ-Bindemotiv -RETSL am Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ . Weil das Fusionskonstrukt auch überexprimiert in der Zelle vorliegt, ist es wahrscheinlicher, dass einzelne PDZ-Bindemotive frei von der Deletionsmutante bleiben und mit endogenem Lin7a interagieren können. Das endogene Lin7a kann  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an die Bindestelle am Zell-Zell-Kontakt dirigieren (Abbildung 38, rechtes Schema).

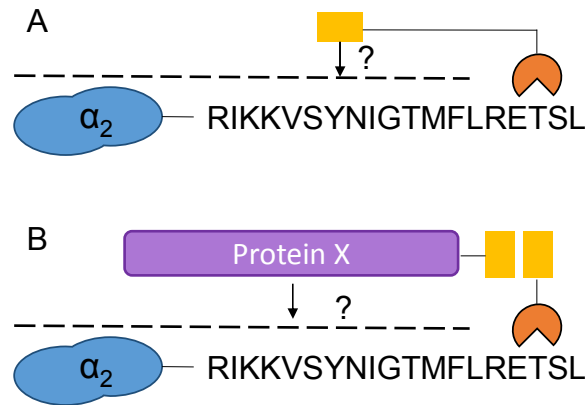


**Abbildung 38: Schematische Darstellung des dominant negativen Effekts, den einzelne Domänen von Lin7a auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  haben**

Endogene Bindestellen für Lin7a sind durch die einzelnen L27-Domänen von Lin7a schneller abgesättigt (links) als überexprimiertes PDZ-Bindemotiv von der  $\alpha_2$ -Untereinheit durch einzelne PDZ-Domänen (rechts).

Die Immunopräzipitationsanalysen mit überexprimierten Lin7a-Konstrukten und dem Fusionskonstrukt  $\beta_1\alpha_2$  belegen eine hauptsächlich PDZ-vermittelte Interaktion zwischen dem Adapterprotein und der NOsGC-Isoform. Überraschenderweise ließ sich auch eine schwache Interaktion zwischen NOsGC-Konstrukten, denen das PDZ-Bindemotiv fehlt, und Lin7a nachweisen. Auch eine Deletion von sowohl dem PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit als auch der PDZ-Domäne von Lin7a verhindert die Interaktion nicht komplett (Abbildung 16). Lediglich wenn PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit und L27-Domäne von Lin7a fehlen, unterbleibt die Interaktion vollständig. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass es neben dem PDZ-Bindemotiv einen weiteren Bereich innerhalb des Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$  gibt, der an der Interaktion zu Lin7a mitwirkt, und dass diese zweite Interaktion über die L27-Domäne von Lin7a vermittelt ist. Dafür kommen sowohl eine direkte Interaktion der L27-Domäne mit einem Bereich der  $\alpha_2$ -Untereinheit (Abbildung 39 A) als auch eine indirekte Interaktion über ein drittes Protein infrage (Abbildung 39 B).





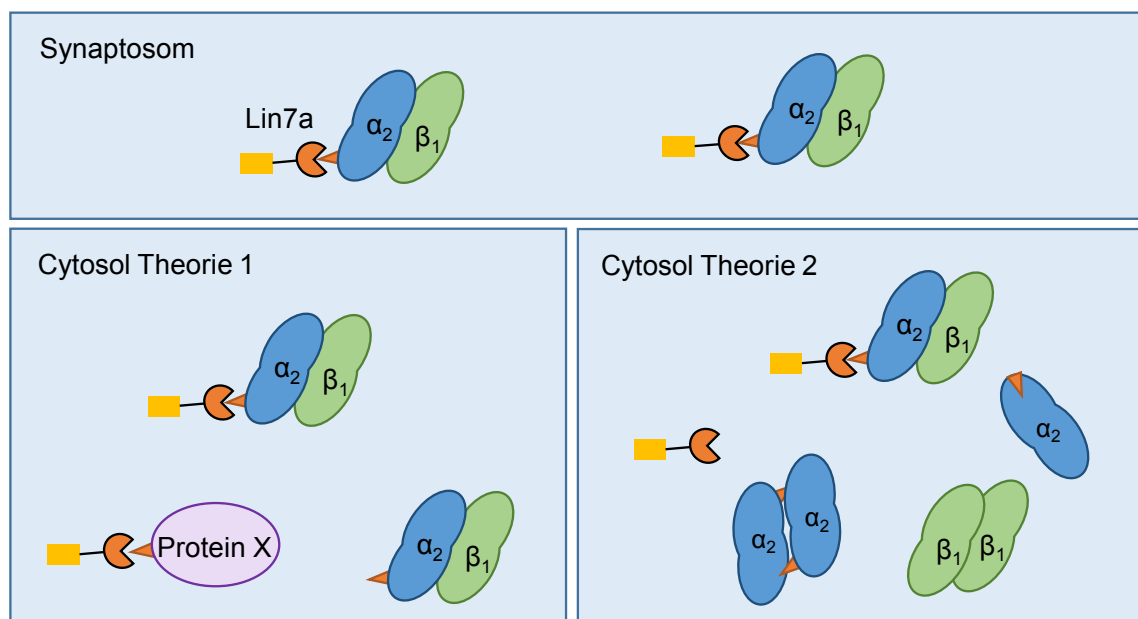
**Abbildung 39: Mögliche Interaktion zwischen der L27-Domäne von Lin7a und der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC**

Immunopräzipitationsanalysen sprechen dafür, dass es neben der Interaktion zwischen dem PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit und der PDZ-Domäne von Lin7a eine weitere Interaktion zwischen den Proteinen gibt. Dafür kommt eine direkte Interaktion der L27-Domäne von Lin7a mit der NOsGC infrage (A). Eine andere Möglichkeit ist die Interaktion über ein unbekanntes drittes Protein, das über eine L27-Domäne an Lin7a und über einen anderen Bereich an die  $\alpha_2$ -Untereinheit bindet (B).

L27-Domänen bilden ihre vollständige Faltung nur bei der Interaktion mit einer weiteren L27-Domäne aus; sie bilden obligate Heterodimere (Harris et al. 2002). In dem NOsGC Heterodimer  $\alpha_2\beta_1$  liegt keine L27-Domäne vor (Montfort et al. 2017). Folglich ist es unwahrscheinlich, dass die L27-Domäne von Lin7a direkt mit der NOsGC interagiert.

Die Immunopräzipitationsanalysen mit synaptosomaler Fraktion und cytosolischer Fraktion des Mäusehirns bestätigen eine Interaktion zwischen endogen exprimiertem Lin7a und der endogenen NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  (Abbildung 17 A). Die Interaktion zwischen Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  ist in der synaptosomalen Fraktion stärker als in der cytosolischen Fraktion, obwohl beide Proteine in Cytosol und Synaptosom gleich viel vorhanden sind. Diese Diskrepanz weist darauf hin, dass Lin7a und die  $\alpha_2$ -Untereinheit im Synaptosom assoziiert vorliegen, während sie im Cytosol großteils dissoziiert sind. Eine mögliche Ursache für die geringere Assoziation ist, dass Lin7a im Cytosol mit anderen Proteinen interagiert als mit der NOsGC. Die PDZ-Domäne von Lin7a interagiert mit einer Vielzahl an Proteinen (Perego et al. 2000; Shelly et al. 2003; Alewine et al. 2007). Folglich ist es denkbar, dass im Cytosol eine Konkurrenz zwischen den PDZ-Bindemotiven um die Interaktion mit Lin7a entsteht und Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  dadurch im Cytosol weniger assoziiert vorliegen (Abbildung 40, Theorie 1). Eine andere mögliche Erklärung ist, dass eine unvollständige Heterodimerisierung der  $\alpha_2$ -Untereinheit mit der  $\beta_1$ -Untereinheit der NOsGC zu einer geringeren Assoziation von Lin7a an die NOsGC führt (Abbildung 40, Theorie 2). Sowohl im überexprimierten System als auch *in vivo* bilden sich neben katalytisch aktiven Heterodimeren auch inaktive Homodimere der NOsGC-Untereinheiten (Zabel et al. 1999; Haase et al. 2010a; Haase et al. 2010b). Bei der einzelnen  $\alpha_2$ -Untereinheit ist das PDZ-Bindemotiv nicht exponiert. Deshalb ist für eine Zell-Zell-

Kontakt-Lokalisation der  $\alpha_2$ -Untereinheit in HEK293-Zellen die Heterodimerisierung mit der  $\beta_1$ -Untereinheit erforderlich (Busker 2013). Es scheint plausibel, dass die Interaktion zwischen endogenem  $\alpha_2$  und endogenem Lin7a analog von einer Heterodimerisierung der NOsGC-Untereinheiten  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  abhängig ist und die Bildung von  $\alpha_2$ -Homomeren zur verminderten Assoziation an Lin7a führt. Eine vermehrte Bildung von  $\alpha_2$ -Homomeren im Cytosol ist in dem abgebildeten Versuch allerdings nicht nachweisbar: Im Präzipitat des  $\alpha_2$ -Antikörpers aus Cytosol wurde etwas mehr  $\beta_1$ -Untereinheit nachgewiesen als im Präzipitat aus Synaptosom. Bei einem vermehrten Vorkommen von  $\alpha_2$ -Homomeren im Cytosol wäre weniger  $\beta_1$ -Untereinheit mit dem  $\alpha_2$ -Antikörper mitpräzipitiert worden.



**Abbildung 40: Schematische Darstellung möglicher Ursachen für eine verminderte Assoziation von Lin7a an die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  im Cytosol**

Im Synaptosom ist Lin7a mit der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  assoziiert. Im Cytosol ist die Interaktion schwächer. Diese verminderte Interaktion kann durch weitere Proteine zustande kommen, die mit Lin7a interagieren (Theorie 1), oder die Untereinheiten der NOsGC bilden Homomere, die nicht mit Lin7a interagieren können.

Von NOsGC-Homodimeren in neuronalem Gewebe von Nagern wurde bereits berichtet (Bidmon et al. 2004; Haase et al. 2010b): Im Großhirn von Ratten nimmt die spezifische Aktivität der NOsGC bei adulten Ratten im Vergleich zu neonatalen Ratten ab, obwohl die Expression von  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  gleich bleibt und die Expression von  $\alpha_2$  sogar zunimmt. Grund dafür ist eine verminderte Heterodimerisierung der Untereinheiten  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  (Bidmon et al. 2004; Haase et al. 2010b). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen das Vorkommen von  $\alpha_1$ -Homodimeren. In der synaptosomalen Fraktion war wie erwartet deutlich weniger  $\alpha_1$ -Untereinheit vorhanden als im Cytosol. Interessanterweise lässt sich mit dem  $\beta_1$ -Antikörper

trotzdem aus dem Synaptosom mehr  $\alpha_1$  präzipitieren als aus dem Cytosol. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit im Cytosol ist folglich zu einem erheblichen Teil nicht mit  $\beta_1$  heterodimerisiert.

Mithilfe der hier vorgestellten Untersuchungen konnte Lin7a als direkter Interaktionspartner des NOsGC-Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$  identifiziert werden. Die Interaktion wurde in Immunopräzipitationen sowohl zwischen überexprimierten Konstrukten als auch in nativem Gewebe gezeigt. Dabei war die Interaktion in der synaptosomalen Fraktion von neuronalem Gewebe besonders stark. Die vergleichbare Lokalisation von Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  in HEK293-Zellen an Zell-Zell-Kontakten legt nahe, dass die Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$  über Lin7a vermittelt ist. Diese These konnte durch die dominant-negative Wirkung der einzelnen Domänen von Lin7a auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation unterstützt werden. Die Interaktion zwischen Lin7a und der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC wurde auch in einer Studie beschrieben, die das Proteom des Hippo-Signalwegs untersucht (Hauri et al. 2013). Der Hippo-Signalweg ist eine Signalkaskade, die die Homöostase von Geweben und Organen steuert. Neben dem Schlüsselenzym des Signalwegs, der Proteinkinase Hippo, spielt der transkriptionelle Coaktivator YAP-1 eine entscheidende Rolle (Dong et al. 2007). YAP-1 interagiert indirekt mit Lin7a (Hauri et al. 2013). Im Rahmen der Untersuchungen von Hauri et al. wurden darum über Affinitätschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie Interaktionspartner von Lin7a identifiziert. Die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC war unter den ermittelten Interaktionspartnern von Lin7a (Hauri et al. 2013). Die Ergebnisse von Hauri et al. bestätigen demnach unsere Daten, die für eine Interaktion zwischen dem PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit und der PDZ-Domäne von Lin7a sprechen.

Die L27-Domäne von Lin7a bindet neben der L27-Domäne von CASK (Butz et al. 1998) in verschiedenen zellulären Kontexten auch an eine Vielzahl anderer MAGUK-Proteine: So ist Lin7 in epithelialen Säugetierzellen über MPP5 mit dem Crumbs-Komplex assoziiert, der für die Zellpolarität eine entscheidende Rolle spielt (Kamberov et al. 2000; Medina et al. 2002; Bachmann et al. 2001). Mit MPP7 und Disc Large 1 (DLG1) bilden Lin7a und Lin7c einen weiteren dreigliedrigen Komplex, der an *adherence junctions* verortet ist (Bohl et al. 2007). Außerdem ist eine Assoziation mit den MAGUK-Proteinen MPP3 und MPP6 beschrieben (Dudak et al. 2011). Über die Interaktion mit diesen unterschiedlichen MAGUKs sind Lin7-Proteine an der Lokalisation verschiedener Rezeptoren und Transporter beteiligt: Der Kaliumkanal Kir 2.3 und der Betain/GABA-Transporter BGT-1 werden über die PDZ-vermittelte Interaktion mit Lin7a an die basolaterale Membran von Nierenepithelzellen gelenkt (Leonoudakis et al. 2004; Massari et al. 2005; Alewine et al. 2007). Das Insulin-Rezeptorsubstrat (IRSp53) ist an der Ausbildung von Filopodien und Neuriten in neuronalen Zellen beteiligt.

Dafür ist eine PDZ-vermittelte Interaktion mit Lin7 entscheidend (Crespi et al. 2012). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass sich die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  in die Folge dieser Rezeptoren und Transporter einreihet und durch die Interaktion mit Lin7a an die Membran gelenkt wird. Durch die Interaktion des NOsGC-Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$  mit Lin7a entsteht so ein membrannahes cGMP-Kompartiment. Die Signalweiterleitung an membrangebundene Zielstrukturen durch ein solches membrannahes cGMP-Kompartiment ist besonders effizient (vgl Kapitel 1.3, Bellingham und Evans 2007). In der Purkinjezellschicht im Kleinhirn bildet zur Plasmamembran dirigierte NOsGC ein membrannahes cGMP-Kompartiment, das die Bildung axonaler Verzweigungen der Korbzellen anregt (Cioni et al. 2013). Auch Lin7a fördert axonales Wachstum, denn in Abwesenheit von Lin7a ist das axonale Wachstum in der Großhirnrinde vermindert. Bei Patienten mit einem entsprechenden Gen-Defekt führt das Fehlen von Lin7a zur Intelligenzminderung (Matsumoto et al. 2014). Dieser Effekt könnte dadurch zustande kommen, dass die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  beim Fehlen von Lin7a nicht mehr an die entsprechende Membran gelenkt wird und demzufolge kein membrannahes cGMP-Kompartiment entsteht. Dies könnte zur Reduktion des axonalen Wachstums führen.

Interessanterweise wurden sowohl für Lin7a als auch für die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC eine Zunahme der Expression während der Entwicklung des Gehirns beschrieben (Jo et al. 1999; Bidmon et al. 2004; Matsumoto et al. 2014). Analog dazu gibt es Hinweise, dass sowohl Mutationen der Lin7-Gene als auch Polymorphismen der  $\alpha_2$ -Untereinheit mit neurologischen Entwicklungsstörungen wie Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und Autismus in Zusammenhang stehen (Lanktree et al. 2008; Li et al. 2014a; Mizuno et al. 2015). Doch sowohl für Lin7a als auch für die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC sind neben dem jeweils anderen Protein weitere Interaktionspartner bekannt. Ob die mangelnde Kompartimentierung von cGMP tatsächlich dazu beiträgt, dass das Fehlen von Lin7a zu neurologischen Störungen führt, müssen weitere Untersuchungen klären.

### 5.3 Andere direkte Interaktionspartner der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$

#### 5.3.1 *Scribble*

Busker wies eine Interaktion zwischen dem Polaritätsprotein Scribble und der PDZ-Erkennungssequenz der  $\alpha_2$ -Untereinheit nach. Sie kam aber zu dem Ergebnis, dass diese Interaktion nicht für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$  verantwortlich ist (Busker 2013). Die Interaktion zwischen der dritten PDZ-Domäne von Scribble und dem PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit wurde außerdem durch *in silico*-Simulationen vorhergesagt (Zhang et al. 2006; Stiffler et al. 2007) und von Ivarsson et al. durch einen abgewandelten Phagendisplay und eine Immunopräzipitation bestätigt (Ivarsson et al. 2014). In Versuchen von Busker nahm die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  durch die Kointransfektion von Scribble-CFP leicht ab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Scribble durch Transfektion mit siRNA herunterreguliert und der Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  untersucht. Passend zu den Ergebnissen von Busker führte der *Knock-down* von endogenem Scribble in HEK293-Zellen zu einer leichten Zunahme der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dagegen, dass Scribble für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  verantwortlich ist. Eventuell kommt es zwischen Lin7a und Scribble zu einer Konkurrenz um die Interaktion mit der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$ .

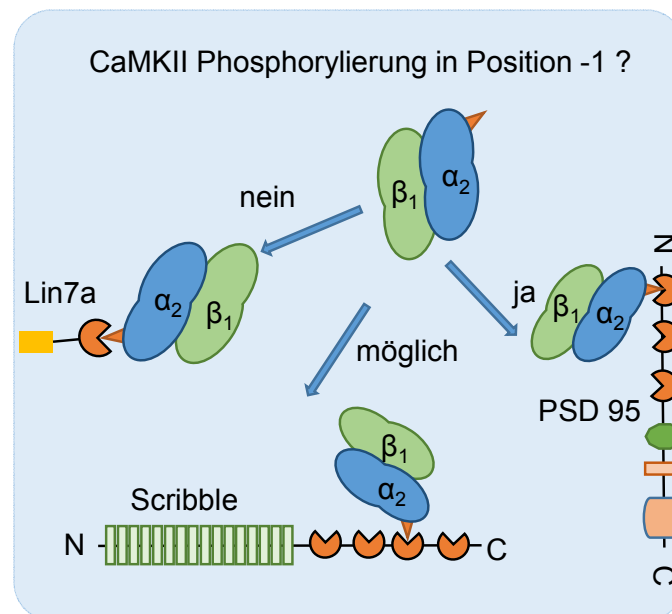
#### 5.3.2 *PSD-95*

Auf die Interaktion des PDZ-Bindemotivs der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC mit den Proteinen PSD-95 und PSD-93 wurde das erste Mal von Russwurm et al. hingewiesen (Russwurm et al. 2001). In Versuchen, die der vorliegenden Arbeit vorausgegangen sind, konnte diese Interaktion durch Affinitätschromatographie mit dem PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit als stationäre Phase bestätigt werden (Hochheiser et al. 2016). Durch Immunopräzipitationen mit endogen exprimierter Isoform  $\alpha_2\beta_1$  in murinem neuronalen Gewebe gelang die Bestätigung der Interaktion zwischen PSD-95 und  $\alpha_2\beta_1$  allerdings nicht (Kapitel 4.2.6). In HEK293-Zellen liegt PSD-95 cytosolisch vor (Soltan et al. 2004). Dies spricht dagegen, dass die Interaktion mit PSD-95 für die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation in HEK293-Zellen verantwortlich ist (Haase 2010). Die Untersuchungen von Russwurm et al. zeigen, dass die Interaktion des PDZ-Bindemotivs der  $\alpha_2$ -Untereinheit mit der carboxyterminalen PDZ-Domäne von PSD-95 besonders stark ist, das PDZ-Bindemotiv aber an jede der drei PDZ-Domänen von PSD-95 binden kann (Russwurm et al. 2001).

Die aminoterminal PDZ-Domäne von PSD-95 hat eine hohe Affinität zu Bindemotiven mit einer sauren Aminosäure in Position -1 (Stiffler et al. 2007). Die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure liegen unter physiologischen Bedingungen dissoziiert vor. An der entsprechenden Position befindet sich also eine negative Ladung (Abbildung 36). Der Carboxyterminus der  $\alpha_2$ -Untereinheit weist an Position -1 ein Serin auf (Tabelle 2). Serin gehört nicht zu den sauren Aminosäuren, kann jedoch von der CAMKII phosphoryliert werden (vgl. Kapitel 4.1.2 und Abbildung 36). Durch die Phosphorylierung des Serins in Position -1 wird in das PDZ-Bindemotiv eine negative Ladung eingebracht. Folglich steigt durch eine Phosphorylierung in Position -1 nach theoretischen *in-silico*-Vorhersagen die Affinität zu der aminoterminalen PDZ-Domäne von PSD-95 (Stiffler et al. 2007). Das NOsGC-Konstrukt, bei dem das Serin in Position -1 durch die saure Asparaginsäure ersetzt ist, liegt in HEK293-Zellen nicht an Zell-Zell-Kontakten vor, sondern wie in HEK293-Zellen überexprimiertes PSD-95 cytosolisch. Entsprechend führt wahrscheinlich auch eine Phosphorylierung des Serins in Position -1 dazu, dass die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC unterdrückt wird. Gleichzeitig ist die Affinität zu der aminoterminalen PDZ-Domäne von PSD-95 durch die Phosphorylierung erhöht. Es ist ein Modell denkbar und in Abbildung 41 dargestellt, in dem die subzelluläre Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  über die Phosphorylierung in Position -1 reguliert wird. Abhängig von Zelltyp und physiologischer Situation in der Zelle phosphoryliert die CAMKII das Serin in Position -1 und dirigiert die NOsGC dadurch an die aminoterminal PDZ-Domäne von PSD-95 oder das im Bindemotiv nicht-phosphorylierte Enzym liegt über Lin7a vermittelt am Zell-Zell-Kontakt vor. Scribble zeigt für beide Varianten des Bindemotivs eine Affinität (Zhang et al. 2006).

**Tabelle 2: Carboxyterminale PDZ-Erkennungssequenz der NOsGC-Untereinheit  $\alpha_2$**

Konsensus Bindesequenz PDZ-Domäne Typ 1		X S/T X L/V					
Carboxyterminus $\alpha_2$	L R E T S L	Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation					
Phosphomimese	L R E T D L	Keine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation					
Position/	-5 -4 -3 -2 -1 0						
Nummerierung	725 726 727 728 729 730						



**Abbildung 41: Mögliches Modell zur Regulierung der Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$  durch die CaMKII**  
 Abhängig von Zelltyp und physiologischem Zustand der Zelle phosphoryliert die CaMKII das PDZ-Bindemotiv und begünstigt dadurch die Interaktion mit anderen Interaktionspartnern wie PSD-95 und Scribble.

#### 5.4 Indirekte Interaktionspartner der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$

Lin7a, der direkte Interaktionspartner der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$ , kommt sowohl assoziiert an *adherens junctions* als auch als Bindungspartner von *tight junctions*-Proteinen vor (Perego et al. 2000; Yamamoto et al. 2002; Straight et al. 2006; Massari et al. 2009). In HEK293-Zellen werden keine *tight junctions* ausgebildet (Piontek et al. 2008). Auch das Einbringen von *tight junction*-Strängen in HEK293-Zellen hat nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$ . Für die Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$  an Zell-Zell-Kontakten ist demnach vermutlich ein Proteinkomplex verantwortlich, der an *adherence junctions* bindet.

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben darüber, über welches Zell-Adhäsionssystem Lin7a an *adherence junctions* bindet: Perego et al. postulieren, dass ein Lin7 enthaltender Komplex über das Cadherin-Catenin-System an Zell-Zell-Verbindungen verankert ist (Perego et al. 2000). Die Gruppe zeigte, dass Cadherine und Lin7 in polarisierten MDCK-Zellen kolokalisieren. Außerdem ließ sich  $\beta$ -Catenin mit einem Antikörper gegen Lin7 aus Hirnlysate (Ratte) präzipitieren. Yamamoto et al. haben eine andere Theorie zu der Verknüpfung zwischen Lin7 und *adherence junctions*. Die Arbeitsgruppe zeigt, dass Lin7 an Nectin-basierten Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist. Dabei ist eine Interaktion von Nectin mit Afadin notwendig für die Lokalisation von Lin7. Es kommt zu keiner direkten Interaktion zwischen Lin7 und Nectin oder Afadin. Das Cadherin-Catenin System ist in dem Modell von Yamamoto et al. nicht für die Lokalisation von Lin7 verantwortlich.

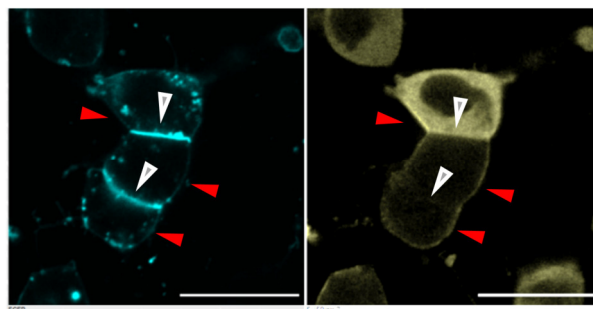
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Lin7a unter Calciumentzug in HEK293-Zellen so verhält wie Nectin-1. Beide Proteine verbleiben am Zell-Zell-Kontakt. Genau wie Lin7a verbleibt auch das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  unter Calciumentzug am Zell-Zell-Kontakt. Im Gegensatz dazu zieht sich Cadherin durch Calciumentzug vom Zell-Zell-Kontakt zurück. Für den Komplex aus Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  kann also festgehalten werden, dass die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation in HEK293-Zellen über calciumunabhängige CAMs wie Nectin-1 vermittelt ist. Unsere Daten unterstützen damit eher die Ergebnisse von Yamamoto et al., wobei Unterschiede der Lin7 Isoformen a, b und c sowie zellspezifische Unterschiede die abweichenden Ergebnisse von Perego et al. erklären können.

##### 5.4.1 Nectin-1

Die Möglichkeit einer indirekten Interaktion zwischen Nectin-1 und der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  wurde weiter untersucht. Die Ergebnisse sind weniger eindeutig als die Ergebnisse zu dem Adapterprotein Lin7a. Das Nectin-Konstrukt, dem das PDZ-Bindemotiv fehlt, über das es mit Afadin,



aber auch mit Gerüstproteinen interagieren kann, verdrängt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  deutlich von den Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 26 A(3)). Diese Verdrängung spricht für eine indirekte Interaktion zwischen Nectin-1 und der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$ . Allerdings verringert das Konstrukt die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  nicht signifikant. Grund dafür könnte auch die Vorgehensweise beim Auszählen der Zell-Zell-Kontakte sein. Der Verdrängungseffekt dieses Nectin-1-Konstruktes auf  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  ist an Kontakten zwischen Zellen, die beide Nectin-1CFP exprimieren, besonders deutlich zu erkennen (Abbildung 42, graue Pfeile). Die gleichen Zellen zeigen aber teilweise zu anderen Zellen, die kein Nectin-1CFP exprimieren, eine Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  (Abbildung 42, rote Pfeile).



**Abbildung 42: Die Verdrängung des NOsGC-Konstruktes vom Zell-Zell-Kontakt durch Nectin-1CFP wird durch die Zählmethode nicht vollständig erfasst**

Graue Pfeile zeigen auf Zell-Zell-Kontakte, an denen ein starkes CFP-Signal des Nectinkonstruktes zu erkennen ist. An diesen Kontakten ist  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  nicht lokalisiert. Rote Pfeile zeigen auf Zell-Zell-Kontakte, an denen  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  am Zell-Zell-Kontakt lokalisiert ist. Die drei abgebildeten Zellen zeigen deutlich eine Verdrängung von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  durch Nectin-1CFP. Trotzdem werden alle drei Zellen als Zellen mit Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  gezählt.

Die in Abbildung 42 abgebildeten drei Zellen werden folglich als Zellen mit Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  erfasst. Diese Verdrängung wird durch die Zählmethode also nicht erfasst. Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht, statt ganzer Zellen einzelne Kontakte zu bewerten. Dieses Vorgehen hat sich jedoch wegen der unterschiedlich geformten HEK293-Zellen in der Praxis nicht bewährt.

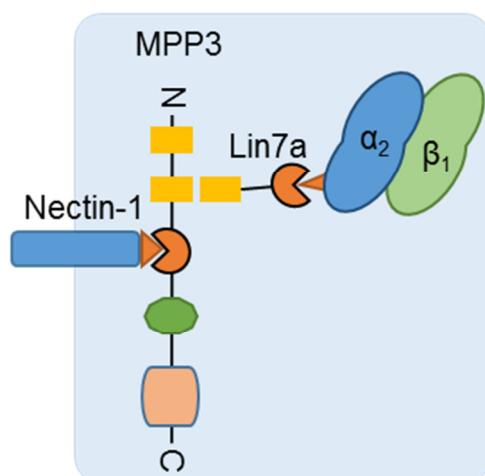
#### 5.4.2 MPP3

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass MPP3 an der Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  an Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist. Überexprimiertes  $\alpha_2\beta_1$  lässt sich mit YFP-MPP3 präzipitieren. Deletionsmutanten von Lin7a verhindern analog zu der im CLSM beobachteten Verdrängung von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  von Zell-Zell-Kontakten (Kapitel 4.2.3) auch die Präzipitation von  $\alpha_2\beta_1$  mit YFP-MPP3. MPP3 wird in HEK293-Zellen endogen exprimiert (Fukuhara et al. 2003) und erfüllt damit eine weitere Voraussetzung, an der Direktion des Fusionskonstruktes  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zu Zell-Zell-Kontakten in unserem System beteiligt zu sein. Nach Affinitätschromatographie mit dem  $\alpha_2$ -PDZ-Bindemotiv als stationärer Phase wurde

MPP3 massenspektroskopisch identifiziert (Hochheiser et al. 2016). Allerdings konnte eine Interaktion zwischen endogen exprimiertem  $\alpha_2\beta_1$  und MPP3 in Synptosom aus Maushirn nicht nachgewiesen werden. Mit einem Antikörper gegen Lin7a ließ sich endogenes MPP3 in geringem Maße aus Synptosom präzipitieren. Somit bestätigt sich die Interaktion zwischen Lin7a und MPP3, die in der Literatur bereits beschrieben ist (Kamberov et al. 2000; Karnak et al. 2002; Rolland et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass MPP3 an der Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$  am Zell-Zell-Kontakt beteiligt ist und so die Lücke zwischen den Nectinen und dem Komplex aus Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  schließt. Allerdings kommen auch eine Reihe anderer MAGUKs dafür infrage. Beispielsweise interagiert MPP5 ebenfalls sowohl mit Nectin-1 (Dudak et al. 2011) als auch mit Lin7a (Hauri et al. 2013; Rolland et al. 2014). Damit kommt es wie MPP3 als Bindeglied zwischen dem CAM und dem binären Komplex aus Lin7a und der NOsGC-Isoform  $\beta_1\alpha_2$  infrage. *In vivo* ist die Verankerung des Lin7a- $\alpha_2\beta_1$ -Komplexes zur Membran vermutlich variabel und abhängig von Zell-Typ und physiologischer Situation.

Zusammengenommen lässt sich aus den hier diskutierten Ergebnissen ein Proteinkomplex ableiten, wie er in Abbildung 43 dargestellt ist. Damit schlägt diese Arbeit zum ersten Mal eine Brücke zwischen dem NO/cGMP-Signalweg und den Nectinen. Nectine sind sowohl an der initialen Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten als auch an der Ausbildung von Synapsen beteiligt (Mizoguchi et al. 2002; Rikitake et al. 2012). Die Frage, welche Rolle das an Nectine dirigierte Heterodimer  $\alpha_2\beta_1$  für diese Funktion spielt, ist ein spannender Anknüpfungspunkt für zukünftige Arbeiten.



**Abbildung 43: Schematische Darstellung des postulierten Komplexes aus Nectin-1, MPP3, Lin7a und der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  der NOsGC**

Nectin-1 interagiert über das PDZ-Bindemotiv mit der Typ-2-PDZ-Domäne von MPP3. MPP3 verfügt als MAGUK der MPP-Familie über zwei L27-Domänen, von der die carboxyterminale Domäne mit der L27-Domäne von Lin7a interagiert. Über die Typ-1-PDZ-Domäne von Lin7a interagiert das Adapterprotein mit dem PDZ-Bindemotiv der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$ .

## 5.5 Komplex zwischen MPP3, Lin7a und Nectin-1

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Proteinkomplex aus Nectin-1, MPP3 und Lin7a untersucht. In der Literatur ist eine direkte Interaktion sowohl zwischen dem Adapterprotein Lin7a und dem MAGUK MPP3 (Karnak et al. 2002; Rolland et al. 2014) als auch zwischen MPP3 und dem CAM Nectin-1 (Dudak et al. 2011) beschrieben. Die indirekte Interaktion zwischen Nectin-1 und Lin7a wurde im vorherigen Abschnitt zum Zell-Adhäsionssystem bereits diskutiert.

### 5.5.1 Interaktion zwischen MPP3 und Lin7a

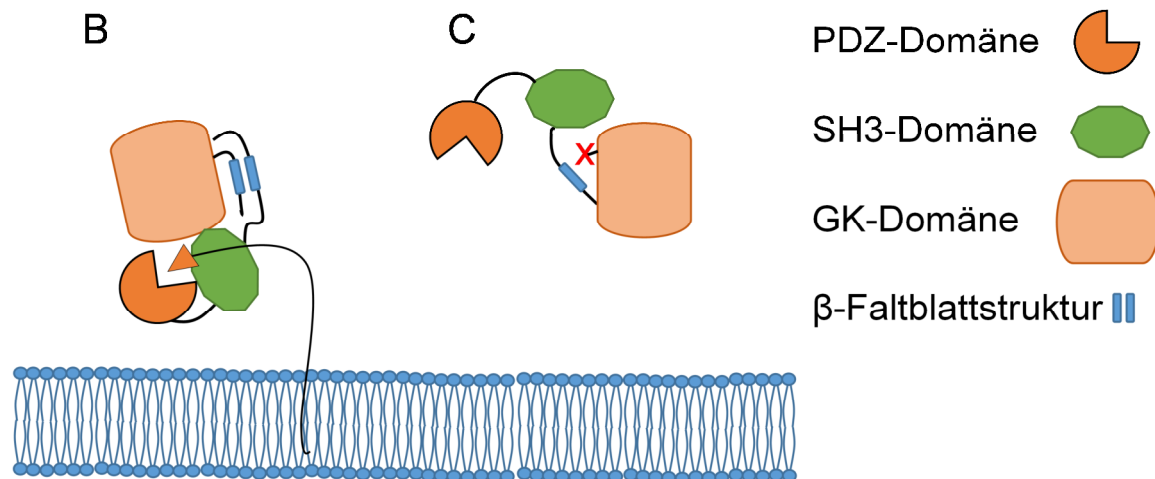
Innerhalb der MAGUK-Superfamilie gehört MPP3 der MPP-Unterfamilie an (MPP für *membrane palmitoylated protein*). Als gemeinsames Strukturmerkmal sind die MAGUKs der MPP-Unterfamilie neben dem zentralen Kern aus PDZ-, SH3- und GK-Domäne im aminoterminalen Bereich aus zwei L27-Domänen aufgebaut (Gosens et al. 2008). Dabei bindet die carboxyterminale L27-Domäne dieses L27-Tandems häufig an Lin7-Proteine (Karnak et al. 2002; Bohl et al. 2007, vgl. Abbildung 37). Durch die Interaktion der aminoterminalen L27-Domäne dieses Tandems mit der einzelnen L27-Domäne eines weiteren Gerüstproteins entsteht ein besonders stabiles Heterotetramer (Feng et al. 2005). Immunopräzipitationsanalysen und Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen haben gezeigt, dass MPP3 über die carboxyterminale L27-Domäne mit Lin7a interagiert (Karnak et al. 2002; Rolland et al. 2014). Die vorliegende Arbeit belegt das Vorkommen eines solchen Lin7a-MPP3-Komplexes in murinem neuronalen Gewebe.

### 5.5.2 Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen Dudak et al. darin, dass MPP3 über das PDZ-Bindemotiv von Nectin-1 vermittelt an Zell-Zell-Kontakte dirigiert wird, und erweitern diese Aussage um den Punkt, dass ein intakter Carboxyterminus von MPP3 für diese Interaktion notwendig ist. Eine mögliche Erklärung für diese Bedeutung des Carboxyterminus von MPP3 findet sich in der Literatur (McGee und Bredt 1999; Shin et al. 2000): Für das MAGUK PSD-95 ist eine intramolekulare Interaktion zwischen SH3- und GK-Domäne beschrieben. Dabei entsteht eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, an der die hydrophoben Aminosäuren carboxyterminal der GK-Domäne beteiligt sind (McGee und Bredt 1999). Wird diese Interaktion unterbunden, ist PSD-95 nicht mehr in der Lage, das Zusammenlagern des Kaliumkanals Kv1.4 zu vermitteln (Shin et al. 2000). Die an der Ausbildung der  $\beta$ -Faltblattstruktur beteiligten Aminosäuren sind konserviert und kommen in mehreren MAGUK-Proteinen, auch in MPP3 vor (Abbildung 44 A). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Dirigieren von MPP3 zum

Zell-Zell-Kontakt durch Nectin-1 auch davon abhängig ist, ob sich eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur ausbilden kann (Abbildung 44 B und C).

## A

[illegible]

**Abbildung 44:  $\beta$ -Faltblattstruktur mit Beteiligung carboxyterminaler hydrophober Aminosäuren in MAGUK-Proteinen**

*A* Alignment der Sequenz von MPP3 mit anderen MAGUK-Proteinen. Angelehnt an Tavares et al. (2001) wurde mit den Sequenzen der MAGUK Proteine CASK (Mensch), PSD-95 (Mensch), SAP97 (Mensch) MPP3 (Maus) und MPP5 (Mensch) beginnend jeweils mit der GK-Domäne ein Alignment durchgeführt. Verwendet wurde das Programm Clustal Omega (Sievers et al. 2011). Der blaue Strich markiert das Ende der GK-Domäne, rot umrandet ist die konservierte, hydrophobe Aminosäureabfolge Tryptophan-Valin-Prolin. *B* Durch die Ausbildung der  $\beta$ -Faltblattstruktur aus den Bereichen amino- und carboxyterminal der GK-Domäne bildet sich ein Supramodul aus PDZ-, SH3- und GK-Domäne, welches mit dem Protein mit PDZ-Bindemotiv besonders fest und spezifisch interagiert. *C* Durch Deletion am Carboxyterminus des MAGUKs ist es zu einer Interaktion nicht mehr in der Lage.

Das mikroskopisch beobachtete Dirigat von MPP3 durch Nectin-1 unterbleibt, sobald eine der folgenden drei Strukturen mutiert ist: (1) carboxyterminale  $\beta$ -Faltblatt-Struktur von MPP3, (2) PDZ-Domäne von MPP3 oder (3) PDZ-Bindemotiv von Nectin-1. Die durchgeführten Immunopräzipitationen zeigen leicht abweichende Ergebnisse. Trotz der Deletion des PDZ-Bindemotivs von Nectin-1 lässt sich eine schwache Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1 $\Delta$ EWYV bzw. Nectin-1 $\Delta$ 13AS nachweisen (Tabelle 3 und Abbildung 33).

**Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse zu der Interaktion zwischen unterschiedlichen MPP3- und Nectin-Konstrukten**

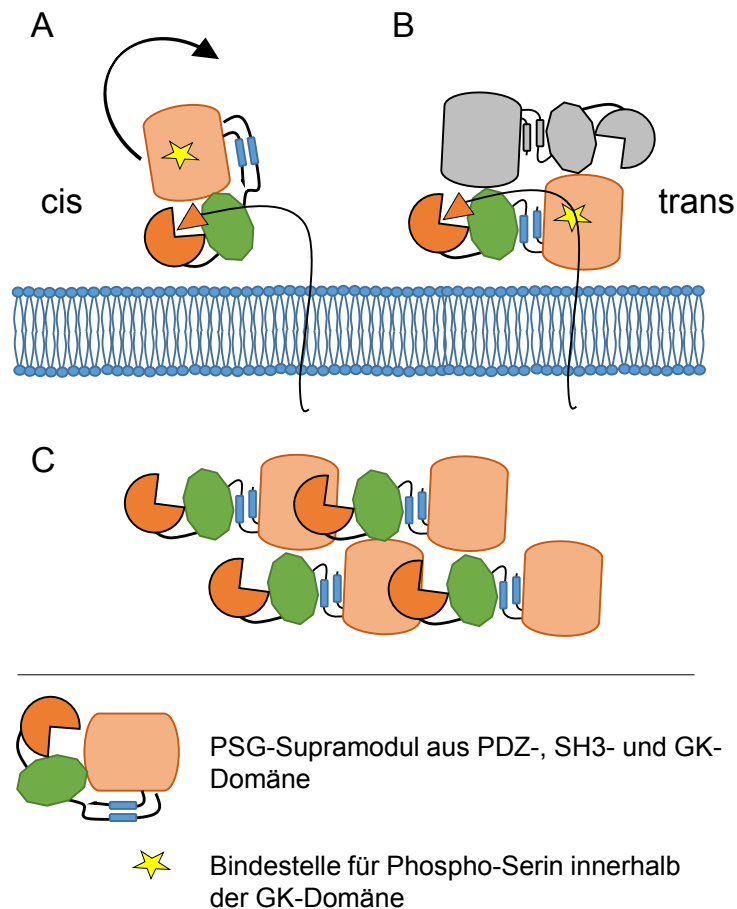
in HEK293-Zellen koexprimierte Interaktionspartner		Funktionelle Interaktion (CLSM)	Physische Interaktion (Immunopräzipitation)
intaktes MPP3	Nectin-1	+	+
MPP3 ohne intramolekulare Interaktion	Nectin-1	-	-
MPP3 ohne funktionsfähige PDZ-Domäne	Nectin-1	-	-
intaktes MPP3	Nectin-1 ohne PDZ-Bindemotiv	-	+

Auch Dudak et al. beobachteten eine physische Interaktion zwischen carboxyterminal deletiertem Nectin-1 und MPP3. Nur die Deletion des kompletten cytosolischen Teils von Nectin-1 führte zum Ausbleiben einer Interaktion (Dudak et al. 2011). Die Arbeitsgruppe schloss daraus, dass es einen weiteren Bereich im cytosolischen Teil von Nectin-1 gibt, der mit MPP3 assoziieren kann. Für diese zusätzliche Interaktion kommt eine Bindung an die GK-Domäne von MPP3 infrage. In der GK-Domäne von MAGUKs der DGL-Unterfamilie hat sich die ursprüngliche GMP-Bindestelle zu einer Bindestelle für phosphorylierte Serin-Seitenketten weiterentwickelt, über die andere Proteine mit dem MAGUK interagieren (Zhu et al. 2011). An der Interaktion zwischen dem MAGUK MPP5, das zur MPP-Unterfamilie gehört, und dem Polaritätsprotein Crumbs (Crb) ist ebenfalls die GK-Domäne des MAGUKs beteiligt. Daran bindet im Gegensatz zu GK-Interaktionen der DLG-Unterfamilie kein phosphoryliertes Serin, sondern eine Glutaminsäure, die, wie oben beschrieben, als phosphomimetische Sei-

tenkette gewertet werden kann (Barrientes et al. 2000; Li et al. 2014b; Reissner und Missler 2014). Für die Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1 ist ein ähnlicher Mechanismus denkbar. An Position -18 von Nectin-1 findet sich eine phosphomimetisch wirkende Glutaminsäure. Sowohl in beiden deletierten Nectinkonstrukten, mit denen im Rahmen dieser Arbeit Immunoprecipitationsanalysen durchgeführt wurden, als auch bei den entsprechenden Versuchen von Dudak et al., war diese Glutaminsäure in Position -18 noch vorhanden (Dudak et al. 2011). Um die Hypothese, dass die Glutaminsäure in Position -18 an die GK-Domäne von MPP3 bindet und so an der Interaktion von Nectin-1 zu MPP3 beteiligt ist, zu prüfen, müssten Immunoprecipitationen mit weiteren Deletionsmutanten von Nectin-1 durchgeführt werden.

### 5.5.3 Oligomerisierung des MAGUKs MPP3

Unter Beteiligung der oben beschriebenen  $\beta$ -Faltblattstruktur am Carboxyterminus kommt es bei MAGUK-Proteinen zur Ausbildung eines Supramoduls aus PDZ-, SH3- und GK-Domäne (PSG-Modul), das die Bindungsspezifität und Affinität der darin enthaltenen PDZ-Domäne stark beeinflusst (Pan et al. 2011). Beispielsweise interagiert das PSG-Modul von MPP5 mit einer hundertfach höheren Affinität mit dem Carboxyterminus des transmembranären Proteins Crb als die einzelne PDZ-Domäne (Li et al. 2014b; Reissner und Missler 2014). PSG-Module können sowohl in einer geschlossenen *cis*-Konformation (Abbildung 45 A) als auch in einer offenen *trans*-Konformation vorliegen (Abbildung 45B). Bei dieser offenen *trans*-Konformation stehen SH3- und GK-Domäne des entsprechenden MAGUKs für die Interaktion mit einem anderen MAGUK zur Verfügung (Wu et al. 2000; McGee et al. 2001). Die Kristallstruktur des an den Carboxyterminus von Crb gebundenen PSG-Moduls von MPP5 hat gezeigt, dass das MAGUK erst durch die Interaktion mit Crb von der geschlossenen *cis*-Konformation zur offenen *trans*-Konformation wechselt (Li et al. 2014b). Somit löst die Interaktion mit Crb eine Dimerisierung oder Oligomerisierung des MAGUKs MPP5 aus (Li et al. 2014b; Reissner und Missler 2014). Nicht nur die Interaktion mit gleichartigen MAGUKs, sondern auch die Interaktion zwischen MPP3 und MPP5 (Kantardzhieva et al. 2006) kann so ausgelöst werden. Analog zu der durch die Interaktion mit Crb ausgelösten Oligomerisierung von MPP5 ist auch eine durch Nectin-1 induzierte Oligomerisierung von MPP3 denkbar.



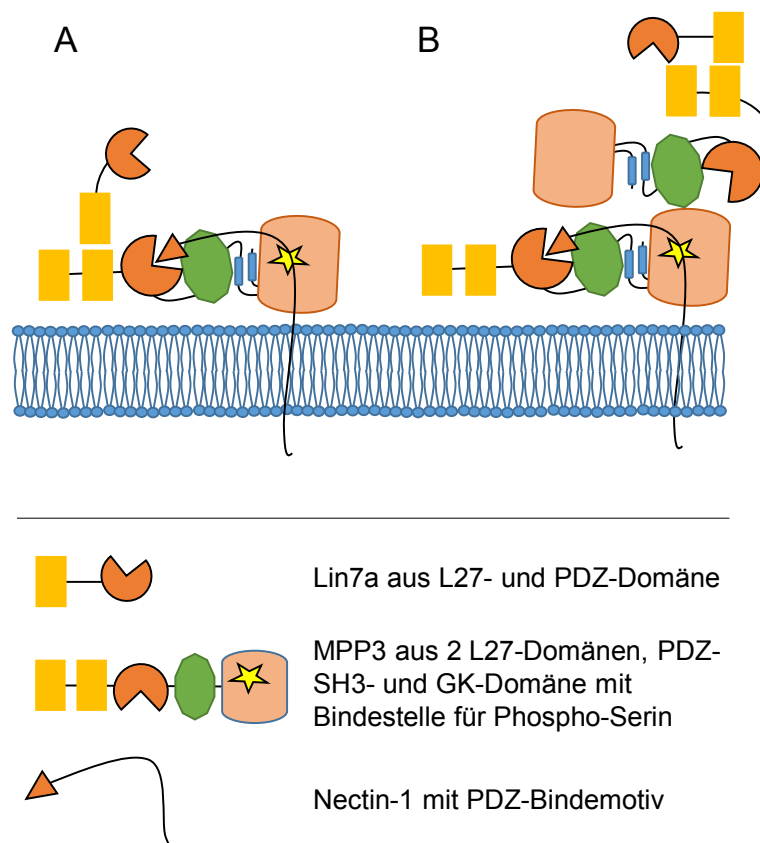
**Abbildung 45: Durch die Interaktion mit einem erweiterten PDZ-Bindemotiv ausgelöste Oligomerisierung von MAGUK-Proteinen**

A Durch die simultane Interaktion des MAGUK-Interaktionspartners mit PDZ-Domäne und GK-Domäne des MAGUKs öffnet sich die intramolekulare Bindung des PSG-Supramoduls. B Das MAGUK liegt nach Bindung an den Interaktionspartner in der trans-Konfiguration vor. An den Bereich der SH3-Domäne, der vorher an die GK-Domäne gebunden hat, kann nun die GK-Domäne eines anderen MAGUKs binden. Analog ist die GK-Domäne frei für die SH3-Domäne eines weiteren MAGUKs. Es ist sowohl die Bildung von Homodimeren (B) als auch eine weitere Oligomerisierung (C) möglich. Modell nach Li et al. (Li et al. 2014b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass Lin7a als ternärer Komplex mit MPP3 und Nectin-1 vorliegen kann. Neben dem Hinweis auf eine calciumunabhängige Lokalisation von Lin7a an Zell-Zell-Kontakten spricht auch die Beeinflussung der Lokalisation von Lin7a durch die Kotransfektion von MPP3 und Nectin-1 für diesen dreiteiligen Komplex. Während allein transfiziertes Lin7a an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert und in der Zelle homogen verteilt vorkommt, führt die Kotransfektion mit MPP3 dazu, dass Lin7a nicht mehr in den Zellkernen vorliegt. Durch Interaktion mit dem 100 kDa großen CFP-MPP3 ist der entstehende Komplex vermutlich zu groß für einen passiven Transport in den Zellkern. Gleichzeitig ist die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von YFP-Lin7a in dem Ansatz mit kotransfiziertem MPP3 schlechter zu erkennen. Dieser dominant negative Effekt von CFP-MPP3 lässt sich dadurch

erklären, dass überexprimiertes, nicht zur Membran dirigiertes CFP-MPP3 mit YFP-Lin7a interagiert und es so im Cytosol hält. Damit stimmen unsere Ergebnisse mit den Beobachtungen von Karnak et al. überein. Die Gruppe beobachtete, dass endogenes Lin7a in MDCK-Zellen nach Transfektion von MPP3 eine diffusere Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation zeigt als in Abwesenheit des MAGUKs (Karnak et al. 2002). Zusammen mit MPP3 wird Lin7a durch kotransfiziertes Nectin-1 zurück an die Zell-Zell-Kontakte dirigiert. Die überexprimierten Konstrukte Nectin-1, CFP-MPP3 und YFP-Lin7a liegen folglich in einem Komplex vor. Damit wird der Komplex aus Lin7a, MPP3 und Nectin-1 zum ersten Mal in seiner Gesamtheit beschrieben (Abbildung 46). Die von Yamamoto et al. aufgeworfene Frage, über welchen Interaktionspartner Nectin-1 und Lin7a miteinander verbunden sind (Yamamoto et al. 2002), kann mithilfe dieser Ergebnisse also beantwortet werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass neben MPP3 auch andere MAGUKs, wie zum Beispiel MPP5, dazu in der Lage sind, mit Nectin-1 und Lin7a einen Komplex aufzubauen (Dudak et al. 2011). Die Stöchiometrie des Komplexes wurde nicht untersucht. Wie oben beschrieben, können MAGUKs, die in der *trans*-Konformation vorliegen, oligomerisieren und so größere Gerüst-Komplexe aufbauen (Schmidt et al. 2004a). Neben der Möglichkeit eines dreiteiligen Komplexes (Abbildung 46 A) können auch größere Komplexe entstehen, bei denen einzelne MPP3-Moleküle nur mit Lin7a oder nur mit Nectin-1 interagieren (Abbildung 46 B).



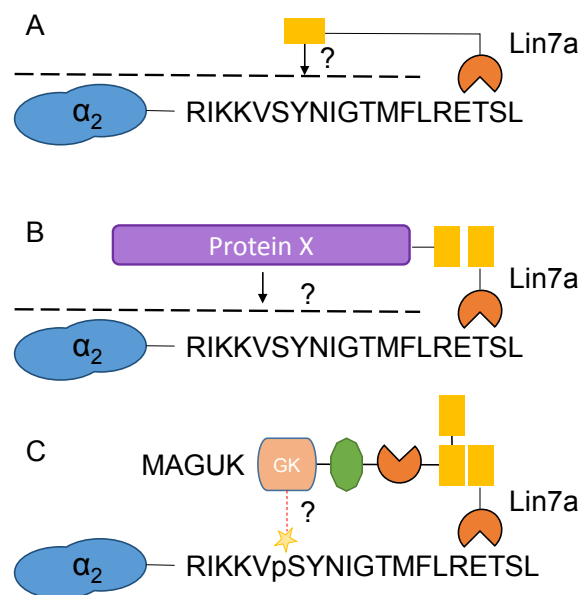


**Abbildung 46: Komplex aus Nectin-1, MPP3 und Lin7a**

Das transmembranäre Nectin-1 interagiert über das PDZ-Bindemotiv mit der PDZ-Domäne von MPP3. Lin7a bindet mit der L27-Domäne an die carboxyterminale L27-Domäne von MPP3. Es ist sowohl ein ternärer Komplex möglich, bei dem Lin7a und Nectin-1 an das gleiche MPP3-Molekül binden (A), als auch eine Oligomerisierung von MPP3-Molekülen, wobei manche Moleküle mit Lin7a und manche mit Nectin-1 interagieren (B).

## 5.6 Komplex aus Nectin-1, MPP3, Lin7a und der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$

Sowohl bei der PDZ-vermittelten Interaktion zwischen Nectin-1 und MPP3 als auch bei der PDZ-vermittelten Interaktion zwischen  $\alpha_2\beta_1$  und Lin7a verhindert die Deletion der PDZ-Erkennungssequenz eine physische Interaktion nicht vollständig (vgl. Abbildung 16 und Abbildung 33). Für die Interaktion zwischen Nectin-1 und dem MAGUK MPP3 wurde eine mögliche zusätzliche Interaktion zwischen der GK-Domäne des MAGUKs und einer Glutaminsäure im cytosolischen Bereich von Nectin-1 bereits diskutiert (Kapitel 5.5.2). Für die Interaktionspartner Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  wurde die Möglichkeit einer zusätzlichen Interaktion über die L27-Domäne von Lin7a oder über ein unbekanntes drittes Protein ebenfalls weiter oben erörtert (Abbildung 47 A und B, vgl. Seite 98). Das Modell von der Interaktion zwischen MPP3 und Nectin-1 lässt sich auf den Komplex aus  $\alpha_2\beta_1$  und Lin7a übertragen: Als drittes Protein, das diese Interaktion zwischen Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  unterstützt, kommt ein MAGUK infrage, das über die GK-Domäne mit der  $\alpha_2$ -Untereinheit interagiert und über die L27-Domäne mit Lin7a verbunden ist (Abbildung 47 C).



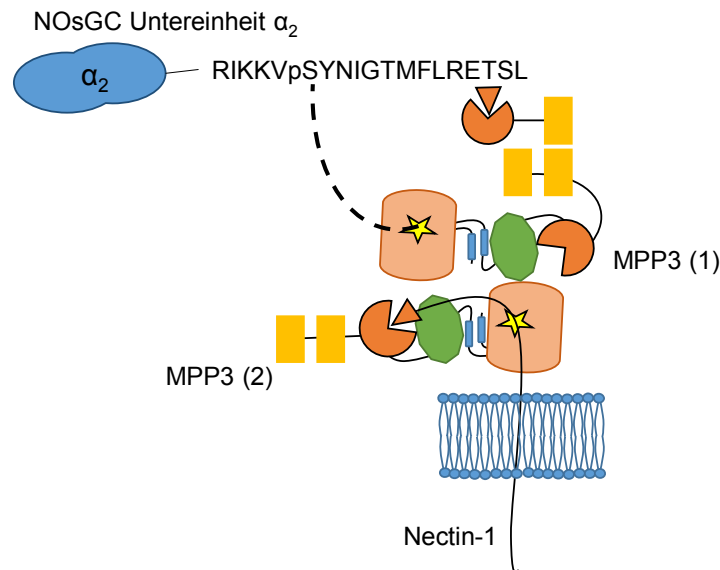
**Abbildung 47: Mögliche Beteiligung der GK-Domäne eines MAGUKs an der Interaktion zwischen der NOsGC-Isoform  $\beta_1\alpha_2$  und Lin7a**

A Eine direkte Interaktion zwischen der L27-Domäne von Lin7a und  $\beta_1\alpha_2$  (A) ist unwahrscheinlich. Dass die Interaktion über ein unbekanntes drittes Protein vermittelt ist (B), wurde bereits oben diskutiert. Ein MAGUK der MPP-Familie könnte über die GK-Domäne an das Phosphoserin in Position 717 der  $\alpha_2$ -Untereinheit binden und gleichzeitig über die L27-Domäne mit Lin7a interagieren.

Bei Manipulationen in der PDZ-Erkennungssequenz der  $\alpha_2$ -Untereinheit bleiben Lin7a und die  $\alpha_2$ -Untereinheit über die Interaktion mit dem MAGUK indirekt verbunden. Wie oben bereits erwähnt (siehe Kapitel 4.1.2), ist das Serin in Position 717 Teil einer hochkonservierten Erkennungssequenz für die Proteinkinasen A und G und liegt großteils phosphoryliert vor (Busker 2013; Mertins et al. 2016). Somit bietet das phosphorylierte Serin 717 eine mögliche

Bindestelle für die GK-Domäne eines MAGUKs (Zhu et al. 2011). Dieses Modell erklärt sowohl die verbleibende physische Interaktion zwischen Lin7a und der NOsGC-Isoform  $\beta_1\alpha_2$  als auch die dynamische Regulation der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation des Fusionskonstruktes  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  (Busker 2013). Ob ein MAGUK die Bindung zwischen Lin7a und der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  unterstützt und ob es sich dabei um das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte MPP3 handelt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. So wäre es möglich, das Serin in Position 717 zu einem nicht phosphorylierbaren Alanin zu mutieren und zu überprüfen, ob sich die physische Interaktion zwischen Lin7a und einem NOsGC-Konstrukt ohne PDZ-Erkennungssequenz noch nachweisen lässt.

Die Hypothese, dass die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  über den Komplex aus Nectin-1, MPP3 und Lin7a an Zell-Zell-Kontakte gelenkt wird, wurde durch die mikroskopische Analyse der kotransfizierten potenziellen Interaktionspartner nicht bestätigt. Das Fusionskonstrukt  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  zeigt durch die Kotransfektion der an diesem Komplex beteiligten Proteine keine veränderte Lokalisation. Durch die transiente Transfektion von drei bis vier Konstrukten in HEK293-Zellen sind die Zellen relativ stark durch Überexpression von Fremdproteinen belastet. Das NOsGC-Fusionskonstrukt ist aus den Untereinheiten  $\alpha_2$  und  $\beta_1$  und dem Fluoreszenzprotein YFP aufgebaut. Es ist mit einer Größe von ca. 200 kDa ein sehr großes Protein. Die Bindung von  $\beta_1\text{YFP}\alpha_2$  an den Komplex aus Nectin-1, MPP3 und Lin7a kann durch das zusätzliche Fluoreszenzprotein sterisch verhindert sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein Komplex aus Nectin-1, MPP3, Lin7a und der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  endogen zwar vorkommen kann, aber die Bindung von  $\alpha_2\beta_1$  an Lin7a in dem konkreten Versuchsaufbau durch ein Überangebot von Nectin-1 oder MPP3 gehemmt wird. In den vorherigen Kapiteln wurde sowohl für die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC als auch für den cytosolischen Bereich von Nectin-1 eine Interaktion mit der GK-Domäne von MPP3 postuliert. Dabei ist wahrscheinlich, dass die GK-Domäne von MPP3 nicht gleichzeitig mit Nectin-1 und dem Carboxyterminus der  $\alpha_2$ -Untereinheit reagieren kann. Vielleicht wird also die Interaktion zwischen  $\alpha_2$ -Untereinheit und GK-Domäne von MPP3 durch überexprimiertes Nectin-1 verhindert, weil Nectin-1 mit der  $\alpha_2$ -Untereinheit um die Bindung an die GK-Domäne von MPP3 konkurriert. Das Vorliegen in einem Komplex wäre dann auch endogen nur möglich, wenn zwei MPP3-Moleküle dimerisieren, von denen eins über die PDZ-Domäne und die GK-Domäne Nectin-1 bindet und das zweite über die L27-Domäne an Lin7a und über die GK-Domäne an die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC bindet. Ein entsprechender Komplex ist in Abbildung 48 dargestellt.



**Abbildung 48: Schematische Darstellung eines Komplexes aus MPP3, Nectin-1, Lin7a und der  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC**

Sowohl für die  $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC als auch für das transmembranäre Nectin-1 wurde eine Interaktion mit der GK-Domäne des MAGUKs MPP3 postuliert. Nach Dimerisierung des MAGUKs könnte ein MPP3 mit Nectin-1 und das zweite mit Lin7a und der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  interagieren, sodass aus den beteiligten Proteinen Nectin-1, MPP3, Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  ein Komplex mit der Stöchiometrie 1:2:1:1 entsteht.

Die Ergebnisse lassen sich auch dahingehend deuten, dass es einen Komplex A aus Lin7a und der NOsGC-Isoform  $\beta_1\alpha_2$  gibt und einen Komplex B aus Nectin-1, MPP3 und Lin7a, dass Lin7a aber nicht gleichzeitig an Nectin-1 und MPP3 und an  $\alpha_2\beta_1$  binden kann. Diese Schlussfolgerung würde bedeuten, dass sich die Bindungseigenschaften der PDZ-Domäne von Lin7a entsprechend der Interaktionspartner verändern, die über die L27-Domäne gebundenen sind. Wie oben bereits dargelegt, interagiert bei MAGUKs nicht die isolierte PDZ-Domäne mit einem PDZ-Bindemotiv. Vielmehr ist das gesamte PSG-Modul aus PDZ-, SH3- und GK-Domäne an der Interaktion beteiligt (Li et al. 2014b). Es gibt Hinweise darauf, dass bei PDZ-Proteinen allgemein die Umgebung der PDZ-Domäne zu ihrer Spezifität beiträgt (Ye und Zhang 2013). Der Einfluss eines Interaktionspartners auf die Bindungseigenschaften der PDZ-Domäne wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Auch wenn sich die Interaktion zwischen der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  und dem Komplex aus Lin7a, MPP3 und Nectin-1 in diesem letzten Versuch nicht bestätigen lässt, sprechen die vorherigen Untersuchungen doch dafür, dass die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  an den beschriebenen Komplex binden kann.

Die vorliegende Arbeit erweitert das Verständnis für die zellulären Begebenheiten, die zu einer Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  führen. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese besondere Lokalisation in HEK293-Zellen von dem Adapterprotein Lin7a

vermittelt wird. Auch im Gehirn von Mäusen interagiert das NOsGC-Heterodimer  $\alpha_2\beta_1$  mit Lin7a. Vermutlich variieren die Interaktionspartner des NOsGC-Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$  abhängig von physiologischer Situation und Zelltyp. In der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch die mögliche Rekrutierung von  $\alpha_2\beta_1$  und Lin7a zu calciumunabhängigen Zell-Zell-Kontakten über MPP3 und Nectin-1 untersucht.

## 6 Zusammenfassung

Die Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylyl-Cyclase (NOsGC) ist das Schlüsselenzym des NO/cGMP-Signalwegs. Von den beiden katalytisch aktiven Isoformen  $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$  liegt letztere in HEK293-Zellen vermittelt über das PDZ-Bindemotiv der  $\alpha_2$ -Untereinheit an Zell-Zell-Kontakten vor. In der vorliegenden Arbeit wurde diese besondere Lokalisation weiter charakterisiert und der direkte Interaktionspartner, der sie vermittelt, als Lin7a identifiziert. Zusätzlich wurde der dreiteilige Komplex aus Lin7a, MPP3 und Nectin-1 untersucht und in seiner Gesamtheit zum ersten Mal beschrieben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Phosphorylierung der  $\beta_1$ -Untereinheit in Position 192 die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der Isoform  $\alpha_2\beta_1$  verstärkt, aber keine Voraussetzung für diese spezifische Lokalisation darstellt. Eine Phosphorylierung innerhalb des PDZ-Bindemotivs, wie sie die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase II (CAMKII) katalysieren kann, verhindert die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation von  $\alpha_2\beta_1$ . Es ist ein Modell denkbar, in dem die Phosphorylierung durch die CAMKII die NOsGC weg von Lin7a am Zell-Zell-Kontakt und hin zu einem anderen Bindungspartner lenkt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde Lin7a als direkter Interaktionspartner des Heterodimers  $\alpha_2\beta_1$  identifiziert. Basierend auf Immunopräzipitationen mit Proben aus murinem neuronalen Gewebe konnte eine besonders starke Interaktion zwischen Lin7a und  $\alpha_2\beta_1$  im Synaptosom nachgewiesen werden. Untersuchungen mit fluoreszenzproteinmarkierten Lin7a-Konstrukten deuten auf einen Zusammenhang zwischen dieser Interaktion und der Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform in HEK293-Zellen.

Sowohl Lin7a als auch die NOsGC-Isoform  $\alpha_2\beta_1$  sind über calciumunabhängige Zell-Adhäsionsmoleküle am Zell-Zell-Kontakt verankert. Während der genaue Aufbau des Komplexes, der Lin7a und  $\beta_1\alpha_2$  an die Membran dirigiert, vermutlich von physiologischer Situation und Zelltyp abhängig ist, wird in der vorliegenden Arbeit ein potenzieller Weg über das Zell-Adhäsionsmolekül Nectin-1 und das MAGUK (*Membrane-associated guanylate kinase*) MPP3 aufgezeigt.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wurde der dreiteilige Komplex aus Nectin-1, MPP3 und Lin7a genauer untersucht. Das MAGUK MPP3 bildet mit den Bereichen amino- und carboxyterminal der GK-Domäne eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, die für die Interaktion mit Nectin-1 erforderlich ist. Vermutlich interagiert das gesamte PSG-Modul von MPP3, bestehend aus PDZ-, SH3- und GK-Domäne, mit dem cytosolischen Teil von Nectin-1.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der NO/cGMP-Signalweg, erweitert nach Derbyshire und Marletta (2012).....	10
Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung einer glutamatergen Synapse mit wahrscheinlicher Lokalisation der am NO/cGMP-Signalweg beteiligten Proteine .....	14
Abbildung 3: Lokalisation der fluoreszenzmarkierten NOsGC-Konstrukte in HEK293-Zellen .....	16
Abbildung 4: Plasmid mit dem Konstrukt CFP-Lin7a. ....	30
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Nectin-1-Konstrukte .....	32
Abbildung 6: Alignment des carboxyterminalen Bereichs von humanem MPP3 und zwei verschiedener Sequenzen murinen MPP3s.....	35
Abbildung 7: Prinzip des konfokalen Mikroskops.....	44
Abbildung 8: Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine CFP und YFP .....	45
Abbildung 9: Einfluss der Mutation Y192F in der $\beta_1$ -Untereinheit der NOsGC auf die Zell-Zell- Kontakt-Lokalisation der Isoform $\alpha_2\beta_1$ .....	48
Abbildung 10: Einfluss der Mutationen S729A und S729D in der $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der Isoform $\alpha_2\beta_1$ .....	50
Abbildung 11: Vorhergesagte Interaktionspartner der PDZ-Bindemotive -RETSL und -RETDL und Lokalisation der entsprechenden Konstrukte in HEK293 Zellen.....	52
Abbildung 12: Assoziation von der NOsGC-Isoform $\beta_1\alpha_2$ mit den fluoreszenzproteinmarkierten Proteinen Lin7a, Scribble und PSD-95 .....	54
Abbildung 13: Lokalisation von Fusionskonstrukt $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ und fluoreszenzmarkierten Proteinen Lin7a, PSD-95 und Scribble in HEK293-Zellen.....	55
Abbildung 14: Expression und Größe fluoreszenzmarkierter Lin7a-Konstrukte.....	56
Abbildung 15: Einfluss unterschiedlicher Lin7a-Konstrukte auf die Lokalisation von $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ .....	58
Abbildung 16: Assoziation von NOsGC-Isoform $\beta_1\alpha_2$ an YFP-Lin7a.....	60
Abbildung 17: In vivo Assoziation von endogenem Lin7a und endogener NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$ .....	61
Abbildung 18: In vivo Assoziation von endogenem PSD-95 und SAP-97 mit der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$ und Lin7a.....	64
Abbildung 19: Endogene Expression von Lin7a in unterschiedlichen Zelllinien .....	65
Abbildung 20: Einfluss des Herunterregulierens von Lin7a in HEK293-Zellen auf die Zell-Zell- Kontakt-Lokalisation von $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ .....	66
Abbildung 21: Einfluss des Herunterregulierens von Scribble in HEK293-Zellen auf die Zell-Zell- Kontakt-Lokalisation von $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ .....	67
Abbildung 22: Unterschiedliche Zell-Zell-Verbindungen in einer polarisierten Zelle .....	69
Abbildung 23: Voneinander unabhängige Lokalisation von CFP-Claudin-1 und $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ in HEK293- Zelle.....	70

Abbildung 24: Auswirkungen von extrazellulärem Calciumentzug auf die Lokalisation von mit YFP markierten Proteinen N-Cadherin, Nectin1, Lin7a und dem NOsGC-Fusionskonstrukt $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ in HEK293-Zellen .....	71
Abbildung 25: Schematische Darstellung der mit $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ kotransfizierten Nectinkonstrukte .....	72
Abbildung 26: Einfluss der Nectin-Konstrukte auf die Lokalisation von $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ .....	74
Abbildung 27: Assoziation der NOsGC-Isoform $\beta_1\alpha_2$ an YFP-MPP3 .....	76
Abbildung 28: In vivo Assoziation von endogenem MPP3 an endogenes Lin7a .....	77
Abbildung 29: Schematische Darstellung von MPP3 und den an unterschiedlichen Seiten fluoreszenzmarkierten MPP3-Konstrukten .....	79
Abbildung 30: Abhängigkeit der Dirigierbarkeit von MPP3 durch Nectin-1 von Carboxyterminus und PDZ-Domäne von MPP3.....	81
Abbildung 31: Abhängigkeit der Dirigierbarkeit von MPP3 durch Nectin-1 von einem intakten PDZ-Bindemotiv von Nectin-1 .....	83
Abbildung 32: Interaktion zwischen Nectin-1 und Varianten von YFP-MPP3 .....	85
Abbildung 33: Interaktion zwischen Varianten von Nectin-1 mit YFP-MPP3.....	86
Abbildung 34: Einfluss der Kotransfektion von MPP3 und Nectin-1 auf die Lokalisation von Lin7a und $\beta_1$ YFP $\alpha_2$ .....	89
Abbildung 35: Position des Phosphoakzeptors Y192 innerhalb der $\beta_1$ -Untereinheit der NOsGC.....	91
Abbildung 36: Vergleich phosphorylierter Aminosäuren mit phosphomimetisch eingesetzten Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure .....	94
Abbildung 37: Schematische Abbildung der Proteine Lin7, Mint-1 (Lin10) und CASK (Lin2).....	95
Abbildung 38: Schematische Darstellung des dominant negativen Effekts, den einzelne Domänen von Lin7a auf die Zell-Zell-Kontakt-Lokalisation der NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$ haben .....	98
Abbildung 39: Mögliche Interaktion zwischen der L27-Domäne von Lin7a und der $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC .....	99
Abbildung 40: Schematische Darstellung möglicher Ursachen für eine verminderte Assoziation von Lin7a an die NOsGC-Isoform $\alpha_2\beta_1$ im Cytosol.....	100
Abbildung 41: Mögliches Modell zur Regulierung der Lokalisation von $\alpha_2\beta_1$ durch die CaMKII.....	105
Abbildung 42: Die Verdrängung des NOsGC-Konstruktes vom Zell-Zell-Kontakt durch Nectin-1CFP wird durch die Zählmethode nicht vollständig erfasst.....	107
Abbildung 43: Schematische Darstellung des postulierten Komplexes aus Nectin-1, MPP3, Lin7a und der Isoform $\alpha_2\beta_1$ der NOsGC.....	108
Abbildung 44: $\beta$ -Faltblattstruktur mit Beteiligung carboxyterminaler hydrophober Aminosäuren in MAGUK-Proteinen .....	110
Abbildung 45: Durch die Interaktion mit einem erweiterten PDZ-Bindemotiv ausgelöste Oligomerisierung von MAGUK-Proteinen .....	113
Abbildung 46: Komplex aus Nectin-1, MPP3 und Lin7a .....	115



Abbildung 47: Mögliche Beteiligung der GK-Domäne eines MAGUKs an der Interaktion zwischen der NOsGC-Isoform $\beta_1\alpha_2$ und Lin7a .....	116
Abbildung 48: Schematische Darstellung eines Komplexes aus MPP3, Nectin-1, Lin7a und der $\alpha_2$ -Untereinheit der NOsGC .....	118

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Carboxyterminus der $\alpha_2$ -Untereinheit im Vergleich mit der Erkennungssequenz der CaMKII .....	93
Tabelle 2: Carboxyterminale PDZ-Erkennungssequenz der NOsGC-Untereinheit $\alpha_2$ .....	104
Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse zu der Interaktion zwischen unterschiedlichen MPP3- und Nectin-Konstrukten .....	111

## 9 Literaturverzeichnis

- Adachi, M.; Hamazaki, Y.; Kobayashi, Y.; Itoh, M.; Tsukita, S.; Furuse, M. (2009): Similar and distinct properties of MUPP1 and patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins. In: *Molecular and Cellular Biology* 29 (9), S. 2372–2389.
- Alewine, C.; Kim, B. Y.; Hegde, V.; Welling, P. A. (2007): Lin-7 targets the Kir 2.3 channel on the basolateral membrane via a L27 domain interaction with CASK. In: *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 293 (6), S. 41.
- Alioua, A.; Tanaka, Y.; Wallner, M.; Hofmann, F.; Ruth, P.; Meera, P.; Toro, L. (1998): The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (49), S. 32950–32956.
- Andrew, P. (1999): Enzymatic function of nitric oxide synthases. In: *Cardiovascular Research* 43 (3), S. 521–531.
- Arnold, W. P.; Mittal, C. K.; Katsuki, S.; Murad, F. (1977): Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (8), S. 3203–3207.
- Arora, K.; Sinha, C.; Zhang, W.; Ren, A.; Moon, C. S.; Yarlagaadda, S.; Naren, A. P. (2013): Compartmentalization of cyclic nucleotide signaling: A question of when, where, and why? *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 465 (10), S. 1397–1407.
- Ashman, D. F.; Lipton R; Melico, M. M.; Prise, T. D. (1963): Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 11, S. 330–334.
- Bachmann, A.; Schneider, M.; Theilenberg, E.; Grawe, F.; Knust, E. (2001): Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. In: *Nature* 414 (6864), S. 638–643.
- Bamberger, A.-M. (2001): Expression and Tissue Localization of Soluble Guanylyl Cyclase in the Human Placenta Using Novel Antibodies Directed against the 2 Subunit. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (2), S. 909–912.

- Barrientes, S.; Cooke, C.; Goodrich, D. W. (2000): Glutamic acid mutagenesis of retinoblastoma protein phosphorylation sites has diverse effects on function. In: *Oncogene* 19 (4), S. 562–570.
- Baumgarten, J. (2017): Entwicklung eines direkten fluoreszenzbasierten Stickstoffmonoxid Biosensors und Untersuchungen zur Lokalisation der membranassoziierten Isoform der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylylcyclase. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig. Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie.
- Bellingham, M.; Evans, T. J. (2007): The  $\alpha 2\beta 1$  isoform of guanylyl cyclase mediates plasma membrane localized nitric oxide signalling. In: *Cellular Signalling* 19 (10), S. 2183–2193.
- Bender, A. T.; Beavo, J. A. (2006): Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. In: *Pharmacological Reviews* 58 (3), S. 488–520.
- Bidmon, H.-J.; Starbatty, J.; Görg, B.; Zilles, K.; Behrends, S. (2004): Cerebral expression of the  $\alpha 2$ -subunit of soluble guanylyl cyclase is linked to cerebral maturation and sensory pathway refinement during postnatal development. In: *Nitric Oxide and Cyclic GMP Signal Transduction in Brain* 45 (6), S. 821–832.
- Biel, M.; Zong, X.; Ludwig, A.; Sautter, A.; Hofmann, F. (1999): Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 135, S. 151–171.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Research* 7 (6), S. 1513–1523.
- Bohl, J.; Brimer, N.; Lyons, C.; Vande Pol, S. B. (2007): The stardust family protein MPP7 forms a tripartite complex with LIN7 and DLG1 that regulates the stability and localization of DLG1 to cell junctions. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (13), S. 9392–9400.
- Boulton, C. L.; Southam, E.; Garthwaite, J. (1995): Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. In: *Neuroscience* 69 (3), S. 699–703.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248–254.

- Bredt, D. S.; Snyder, S. H. (1990): Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (2), S. 682–685.
- Brenman, J. E.; Chao, D. S.; Gee, S. H.; McGee, A. W.; Craven, S. E.; Santillano, D. R. et al. (1996): Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-syntrophin mediated by PDZ domains. In: *Cell* 84 (5), S. 757–767.
- Broekmans, K.; Stegbauer, J.; Potthoff, S. A.; Russwurm, M.; Koesling, D.; Mergia, E. (2016): Angiotensin II-Induced Hypertension Is Attenuated by Reduction of Sympathetic Output in NO-Sensitive Guanylyl Cyclase 1 Knockout Mice. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 356 (1), S. 191–199.
- Budworth, J.; Meillerais, S.; Charles, I.; Powell, K. (1999): Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263 (3), S. 696–701.
- Bundespräsidialamt (02.12.2015): Bundespräsident Gauck verleiht den Deutschen Zukunftspreis 2015. Online verfügbar unter <http://presseservice.deutscher-zukunftspreis.de/pressemitteilungen/jahrgaenge/2015/02-dezember-2015-pressemitteilung-des-bundespraesidialamtes>, zuletzt geprüft am 15.11.2016.
- Busker, M.; Neidhardt, I.; Behrends, S. (2014): Nitric oxide activation of guanylate cyclase pushes the  $\alpha$ 1 signaling helix and the  $\beta$ 1 heme-binding domain closer to the substrate-binding site. In: *Journal of Biological Chemistry* 289 (1), S. 476–484.
- Busker, M. (2013): Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus der NO-sensitiven Guanylat-Cyclase und zu ihrer subzellulären Lokalisation. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig. Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie.
- Butz, S.; Okamoto, M.; Sudhof, T. C. (1998): A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. In: *Cell* 94 (6), S. 773–782.
- Buxton, I. L.; Brunton, L. L. (1983): Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. In: *Journal of Biological Chemistry* 258 (17), S. 10233–10239.
- Buys, E. S.; Raher, M. J.; Kirby, A.; Shahid, M.; Baron, D. M.; Hayton, S. R. et al. (2012): Genetic modifiers of hypertension in soluble guanylate cyclase  $\alpha$ 1-deficient mice. In: *Journal of Clinical Investigation* 122 (8), S. 3024.

- Cary, S. P. L.; Winger, J. A.; Derbyshire, E. R.; Marletta, M. A. (2006): Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. In: *Trends in Biochemical Sciences* 31 (4), S. 231–239.
- Cherry, P. D.; Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V.; Jothianandan, D. (1982): Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (6 I), S. 2106–2110.
- Christopherson, K. S.; Hillier, B. J.; Lim, W. A.; Brecht, D. S. (1999): PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (39), S. 27467–27473.
- Cioni, J.-M.; Telley, L.; Saywell, V.; Cadilhac, C.; Jourdan, C.; Huber, A. B. et al. (2013): SEMA3A Signaling Controls Layer-Specific Interneuron Branching in the Cerebellum. In: *Current Biology* 23 (10), S. 850–861.
- Cohen, N. A.; Brenman, J. E.; Snyder, S. H.; Brecht, D. S. (1996): Binding of the Inward Rectifier K<sup>+</sup> Channel Kir 2.3 to PSD-95 is regulated by Protein Kinase A Phosphorylation. In: *Neuron* 17 (4), S. 759–767.
- Cohen, R. S.; Blomberg, F.; Berzins, K.; Siekevitz, P. (1977): The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition. In: *Journal of Cell Biology* 74 (1), S. 181–203.
- Corbin, J. D.; Francis, S. H. (1999): Cyclic GMP phosphodiesterase-5: Target of sildenafil. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (20), S. 13729–13732.
- Crespi, A.; Ferrari, I.; Lonati, P.; Disanza, A.; Fornasari, D.; Scita, G. et al. (2012): LIN7 regulates the filopodium- and neurite-promoting activity of IRSp53. In: *Journal of Cell Science* 125 (19), S. 4543–4554.
- Dejana, E. (2004): Endothelial cell-cell junctions: happy together. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (4), S. 261–270.
- Derbyshire, E. R.; Marletta, M. A. (2012): Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. In: *Annual Review of Biochemistry*, 81, S. 533–559.
- Diamond, J. M. (1977): Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. In: *The Physiologist* 20 (1), S. 10–18.
- Dissmeyer, N.; Schnittger, A. (2011): Use of Phospho-Site Substitutions to Analyze the Biological Relevance of Phosphorylation Events in Regulatory Networks. In: Nico Dissmeyer

- und Arp Schnittger (Hg.): Plant kinases. Methods and protocols, Bd. 779. New York: Humana; Springer (Methods in Molecular Biology, v. 779), S. 93–138.
- Doerks, T.; Bork, P.; Kamberov, E.; Makarova, O.; Muecke, S.; Margolis, B. (2000): L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7. In: *Trends in Biochemical Sciences* 25 (7), S. 317–318.
- Dong, J.; Feldmann, G.; Huang, J.; Wu, S.; Zhang, N.; Comerford, S. A. et al. (2007): Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. In: *Cell* 130 (6), S. 1120–1133.
- Doyle, D. A.; Lee, A.; Lewis, J.; Kim, E.; Sheng, M.; MacKinnon, R. (1996): Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. In: *Cell* 85 (7), S. 1067–1076.
- Dudak, A.; Kim, J.; Cheong, B.; Federoff, H. J.; Lim, S. T. (2011): Membrane palmitoylated proteins regulate trafficking and processing of nectins. In: *European Journal of Cell Biology* 90 (5), S. 365–375.
- Engelhardt, J.; Knebel, W. (1993): Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. In: *Physik in unserer Zeit* 24 (2), S. 70–78.
- Erdmann, E.; Semigran, M. J.; Nieminen, M. S.; Gheorghiade, M.; Agrawal, R.; Mitrovic, V.; Mebazaa, A. (2013): Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure. In: *European Heart Journal* 34 (1), S. 57–67.
- Evgenov, O. V.; Pacher, P.; Schmidt, P. M.; Haskó, G.; Schmidt, H. H. H. W.; Stasch, J.-P. (2006): NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. In: *Nature reviews. Drug discovery* 5 (9), S. 755–768.
- Fanning, A. S.; Anderson, J. M. (1999): PDZ domains: Fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. In: *Journal of Clinical Investigation* 103 (6), S. 767–772.
- Feng, W.; Long, J.-F.; Zhang, M. (2005): A unified assembly mode revealed by the structures of tetrameric L27 domain complexes formed by mLin-2/mLin-7 and Patj/Pals1 scaffold proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (19), S. 6861–6866.

- Ferrendelli, J. A.; Chang, M. M.; Kinscherf, D. A. (1974): Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. In: *Journal of Neurochemistry* 22 (4), S. 535–540.
- Fesenko, E.; Kolesnikov, S.; Lyubarsky, A. L. (1985): Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. In: *Nature* 313 (6000), S. 310–313.
- Follmann, M.; Griebenow, N.; Hahn, M. G.; Hartung, I.; Mais, F.-J.; Mittendorf, J. et al. (2013): The chemistry and biology of soluble guanylate cyclase stimulators and activators. In: *Angewandte Chemie - International Edition* 52 (36), S. 9442–9462.
- Friebe, A.; Mergia, E.; Dangel, O.; Lange, A.; Koesling, D. (2007): Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (18), S. 7699–7704.
- Friebe, A.; Schultz, G.; Koesling, D. (1996): Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. In: *EMBO Journal* 15 (24), S. 6863–6868.
- Fukuhara, H.; Masuda, M.; Yageta, M.; Fukami, T.; Kuramochi, M.; Maruyama, T. et al. (2003): Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of *Drosophila* tumor suppressor Dlg. In: *Oncogene* 22 (40), S. 6160–6165.
- Funke, L.; Dakoji, S.; Brecht, D. S. (2005): Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions In: *Annual Review of Biochemistry* 74, S. 219–245.
- Furchgott, R. F.; Vanhoutte, P. M. (1989): Endothelium-derived relaxing and contracting factors. In: *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 3 (9), S. 2007–2018.
- Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In: *Nature* 288 (5789), S. 373–376.
- Galiè, N.; Ghofrani, H. A.; Torbicki, A.; Barst, R. J.; Rubin, L. J.; Badesch, D. et al. (2005): Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. In: *New England Journal of Medicine* 353 (20), S. 2148–2157.
- Garthwaite, J. (2008): Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. In: *European Journal of Neuroscience* 27 (11), S. 2783–2802.



- Garthwaite, J.; Charles, S. L.; Chess-Williams, R. (1988): Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. In: *Nature* 336 (6197), S. 385–388.
- Gerzer, R.; Hofmann, F.; Schultz, G. (1981): Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. In: *European Journal of Biochemistry / FEBS* 116 (3), S. 479–486.
- Gosens, I.; den Hollander, A. I.; Cremers, F.P.M.; Roepman, R. (2008): Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. In: *Experimental Eye Research* 86 (5), S. 713–726.
- Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. (2010): A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. In: *Nucleic Acids Research* 38 (Web Server issue), W695-9.
- Griebenow, N.; Schirok, H.; Mittendorf, J.; Straub, A.; Follmann, M.; Stasch, J.-P. et al. (2013): Identification of acidic heterocycle-substituted 1H-pyrazolo3,4-bpyridines as soluble guanylate cyclase stimulators. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23 (5), S. 1197–1200.
- Griffith, F. (1928): The Significance of Pneumococcal Types. In: *The Journal of Hygiene* 27 (2), S. 113–159.
- Gumbiner, Barry M. (2005): Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (8), S. 622–634.
- Haase, N.; Haase, T.; Kraehling, J. R.; Behrends, S. (2010a): Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive guanylyl cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: Evidence for isoform specific activation by ciguates. In: *Biochemical Pharmacology* 80 (11), S. 1676–1683.
- Haase, N.; Haase, T.; Seeanner, M.; Behrends, S. (2010b): Nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activity decreases during cerebral postnatal development because of a reduction in heterodimerization. In: *Journal of Neurochemistry* 112 (2), S. 542–551.
- Haase, T. (2010): Untersuchungen an fluoreszenzmarkierten Enzymvarianten der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig. Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie.

- Haase, T.; Haase, N.; Kraehling, J. R.; Behrends, S. (2010c): Fluorescent fusion proteins of soluble guanylyl cyclase indicate proximity of the heme nitric oxide domain and catalytic domain. In: *PLoS ONE* 5 (7).
- Haghikia, A.; Mergia, E.; Friebe, A.; Eysel, U. T.; Koesling, D.; Mittmann, T. (2007): Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *Journal of Neuroscience* 27 (4), S. 818–823.
- Harris, B. Z.; Venkatasubrahmanyam, S.; Lim, W. A. (2002): Coordinated folding and association of the LIN-2, -7 (L27) domain. An obligate heterodimerization involved in assembly of signaling and cell polarity complexes. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (38), S. 34902–34908.
- Harteneck, C.; Wedel, B.; Koesling, D.; Malkewitz, J.; Böhme, E.; Schultz, G. (1991): Molecular cloning and expression of a new  $\alpha$ -subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the  $\alpha$ -subunits of the enzyme. In: *FEBS Letters* 292 (1-2), S. 217–222.
- Hauri, S.; Wepf, A.; van Drogen, A.; Varjosalo, M.; Tapon, N.; Aebersold, R.; Gstaiger, M. (2013): Interaction proteome of human Hippo signaling: modular control of the co-activator YAP1. In: *Molecular Systems Biology* 9, S. 713.
- Hibbs, J. B., JR; Vavrin, Z.; Taintor, R. R. (1987): L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 138 (2), S. 550–565.
- Hochheiser, J.; Haase, T.; Busker, M.; Sömmer, A.; Kreienkamp, H.-J.; Behrends, S. (2016): Heterodimerization with the  $\beta$ 1 subunit directs the  $\alpha$ 2 subunit of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase to calcium-insensitive cell-cell contacts in HEK293 cells: Interaction with Lin7a. In: *Biochemical Pharmacology* 122, S. 23–32.
- Hoenicka, M.; Becker, E.-M.; Apeler, H.; Sirichoke, T.; Schröder, H.; Gerzer, R.; Stasch, J.-P. (1999): Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: Stimulation by YC-1, nitric oxide, and carbon monoxide. In: *Journal of Molecular Medicine* 77 (1), S. 14–23.
- Hoenicka, M.; Schmid, C. (2008): Cardiovascular effects of modulators of soluble guanylyl cyclase activity. In: *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 6 (4), S. 287–301.

- Hoffmüller, U.; Russwurm, M.; Kleinjung, F.; Ashurst, J.; Oschkinat, H.; Volkmer-Engert, R. et al. (1999): Interaction of a PDZ protein domain with a synthetic library of all human protein C termini. In: *Angewandte Chemie - International Edition* 38 (13-14), S. 2000–2004.
- Holt, A. W.; Martin, D. N.; Shaver, P. R.; Adderley, S. P.; Stone, J. D.; Joshi, C. N. et al. (2016): Soluble guanylyl cyclase-activated cyclic GMP-dependent protein kinase inhibits arterial smooth muscle cell migration independent of VASP-serine 239 phosphorylation. In: *Cellular Signalling* 28 (9), S. 1364–1379.
- Hornbeck, P. V.; Zhang, B.; Murray, B.; Kornhauser, J. M.; Latham, V.; Skrzypek, E. (2015): PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. In: *Nucleic acids research* 43 (Database issue), D512-20.
- Iakoucheva, L. M.; Radivojac, P.; Brown, C. J.; O'Connor, T. R.; Sikes, J. G.; Obradovic, Z.; Dunker, A. K. (2004): The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. In: *Nucleic Acids Research* 32 (3), S. 1037–1049.
- Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24), S. 9265–9269.
- Ishiuchi, T.; Takeichi, M. (2012): Nectins localize Willin to cell-cell junctions. In: *Genes to Cells* 17 (5), S. 387–397.
- Ivarsson, Y.; Arnold, R.; McLaughlin, M.; Nim, S.; Joshi, R.; Ray, D. et al. (2014): Large-scale interaction profiling of PDZ domains through proteomic peptide-phage display using human and viral phage peptidomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (7), S. 2542–2547.
- Jo, K.; Derin, R.; Li, M.; Bredt, D. S. (1999): Characterization of MALS/Velis-1, -2, and -3: a family of mammalian LIN-7 homologs enriched at brain synapses in association with the postsynaptic density-95/NMDA receptor postsynaptic complex. In: *Journal of Neuroscience* 19 (11), S. 4189–4199.
- Juilfs, D. M.; Soderling, S.; Burns, F.; Beavo, J. A. (1999): Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 135, S. 67–104.

- Kaech, S. M.; Whitfield, C. W.; Kim, S. K. (1998): The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. In: *Cell* 94 (6), S. 761–771.
- Kamberov, E.; Makarova, O.; Roh, M.; Liu, A.; Karnak, D.; Straight, S.; Margolis, B. (2000): Molecular cloning and characterization of Pals, proteins associated with mLin-7. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (15), S. 11425–11431.
- Kantardzhieva, A.; Alexeeva, S.; Versteeg, I.; Wijnholds, J. (2006): MPP3 is recruited to the MPP5 protein scaffold at the retinal outer limiting membrane. In: *FEBS Journal* 273 (6), S. 1152–1165.
- Karnak, D.; Lee, S.; Margolis, B. (2002): Identification of multiple binding partners for the amino-terminal domain of synapse-associated protein 97. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (48), S. 46730–46735.
- Karow, D. S.; Pan, D.; Davis, J. H.; Behrends, S.; Mathies, R. A.; Marletta, M. A. (2005): Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. In: *Biochemistry* 44 (49), S. 16266–16274.
- Kennedy, M. B. (2000): Signal-processing machines at the postsynaptic density. In: *Science* 290 (5492), S. 750–754.
- Kennelly, P. J.; Krebs, E. G. (1991): Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. In: *Journal of Biological Chemistry* 266 (24), S. 15555–15558.
- Koesling, D.; Harteneck, C.; Humbert, P.; Bosserhoff, A.; Frank, R.; Schultz, G.; Bohme, E. (1990): The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. In: *FEBS Letters* 266 (1-2), S. 128–132.
- Koesling, D.; Herz, J.; Gausepohl, H.; Niroomand, F.; Hinsch, K. D.; Mulsch, A. et al. (1988): The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. In: *FEBS Letters* 239 (1), S. 29–34.
- Koglin, M.; Stasch, J.-P.; Behrends, S. (2002): Bay 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 (4), S. 1057–1062.

- Kumar, V.; Martin, F.; Hahn, M. G.; Schaefer, M.; Stamler, J. S.; Stasch, J.-P.; van den Akker, F. (2013): Insights into BAY 60-2770 activation and S-nitrosylation-dependent desensitization of soluble guanylyl cyclase via crystal structures of homologous Nostoc H-NOX domain complexes. In: *Biochemistry* 52 (20), S. 3601–3608.
- Lanktree, Matthew; Squassina, Alessio; Krinsky, Marilee; Strauss, John; Jain, Umesh; Macciardi, Fabio et al. (2008): Association study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and LIN-7 homolog (LIN-7) genes with adult attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *American Journal of Medical Genetics*. 147B (6), S. 945–951.
- Lapp, H.; Mitrovic, V.; Franz, N.; Heuer, H.; Buerke, M.; Wolfertz, J. et al. (2009): Cinaciguat (BAY 58-2667) improves cardiopulmonary hemodynamics in patients with acute decompensated heart failure. In: *Circulation* 119 (21), S. 2781–2788.
- Leiria, L. O.; Silva, F. H.; Davel, A.P.C.; Alexandre, E. C.; Calixto, M. C.; Nucci, G. de et al. (2014): The soluble guanylyl cyclase activator BAY 60-2770 ameliorates overactive bladder in obese mice. In: *Journal of Urology* 191 (2), S. 539–547.
- Leonoudakis, D.; Conti, L. R.; Radeke, C. M.; McGuire, L. M. M.; Vandenberg, C. A. (2004): A Multiprotein Trafficking Complex Composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 Is Associated with Inward Rectifier Kir2 Potassium Channels. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (18), S. 19051–19063.
- Li, Jingjing; Shi, Minyi; Ma, Zhihai; Zhao, Shuchun; Euskirchen, Ghia; Ziskin, Jennifer et al. (2014a): Integrated systems analysis reveals a molecular network underlying autism spectrum disorders. In: *Molecular Systems Biology* 10, S. 774.
- Li, Y.; Wei, Z.; Yan, Y.; Wan, Q.; Du, Q.; Zhang, M. (2014b): Structure of Crumbs tail in complex with the PALS1 PDZ-SH3-GK tandem reveals a highly specific assembly mechanism for the apical Crumbs complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (49), S. 17444–17449.
- Lucas, K. A.; Pitari, G. M.; Kazerounian, S.; Ruiz-Stewart, I.; Park, J.; Schulz, S. et al. (2000): Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. In: *Pharmacological Reviews* 52 (3), S. 375–413.
- Massari, S.; Perego, C.; Padovano, V.; D'Amico, A.; Raimondi, A.; Francolini, M.; Pietrini, G. (2009): LIN7 mediates the recruitment of IRSp53 to tight junctions. In: *Traffic* 10 (2), S. 246–257.

- Massari, S.; Vanoni, C.; Longhi, R.; Rosa, P.; Pietrini, G. (2005): Protein kinase C-mediated phosphorylation of the BGT1 epithelial gamma-aminobutyric acid transporter regulates its association with LIN7 PDZ proteins: a post-translational mechanism regulating transporter surface density. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (8), S. 7388–7397.
- Matsumoto, A.; Mizuno, M.; Hamada, N.; Nozaki, Y.; Jimbo, E. F.; Momoi, M. Y. et al. (2014): LIN7A depletion disrupts cerebral cortex development, contributing to intellectual disability in 12q21-deletion syndrome. In: *PLoS ONE* 9 (3).
- Mayer, B.; Klatt, P.; Böhme, E.; Schmidt, K. (1992): Regulation of neuronal nitric oxide and cyclic GMP formation by  $\text{Ca}^{2+}$ . In: *Journal of Neurochemistry* 59 (6), S. 2024–2029.
- McGee, A. W.; Bredt, D. S. (1999): Identification of an Intramolecular Interaction between the SH3 and Guanylate Kinase Domains of PSD-95. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (25), S. 17431–17436.
- McGee, A. W.; Dakoji, S. R.; Olsen, O.; Bredt, D. S.; Lim, W. A.; Prehoda, K. E. (2001): Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. In: *Molecular Cell* 8 (6), S. 1291–1301.
- Medina, E.; Lemmers, C.; Lane-Guermonprez, L.; Le Bivic, A. (2002): Role of the Crumbs complex in the regulation of junction formation in Drosophila and mammalian epithelial cells. In: *Biology of the Cell* 94 (6), S. 305–313.
- Mergia, E.; Friebe, A.; Dangel, O.; Russwurm, M.; Koesling, D. (2006): Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (6), S. 1731–1737.
- Mergia, E.; Russwurm, M.; Zoidl, G.; Koesling, D. (2003): Major occurrence of the new  $\alpha 2\beta 1$  isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. In: *Cellular Signalling* 15 (2), S. 189–195.
- Mertins, P.; Mani, D. R.; Ruggles, K. V.; Gillette, M. A.; Clauser, K. R.; Wang, P. et al. (2016): Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. In: *Nature* 534 (7605), S. 55–62.
- Meurer, S.; Pioch, S.; Gross, S.; Müller-Esterl, W. (2005): Reactive Oxygen Species Induce Tyrosine Phosphorylation of and Src Kinase Recruitment to NO-sensitive Guanylyl Cyclase. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (39), S. 33149–33156.

- Misawa, H.; Kawasaki, Y.; Mellor, J.; Sweeney, N.; Jo, K.; Nicoll, R. A.; Bredt, D. S. (2001): Contrasting Localizations of MALS/LIN-7 PDZ Proteins in Brain and Molecular Compensation in Knockout Mice. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (12), S. 9264–9272.
- Mittendorf, J.; Weigand, S.; Alonso-Alija, C.; Bischoff, E.; Feurer, A.; Gerisch, M. et al. (2009): Discovery of riociguat (BAY 63-2521): A potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. In: *ChemMedChem* 4 (5), S. 853–865.
- Mizoguchi, A.; Nakanishi, H.; Kimura, K.; Matsubara, K.; Ozaki-Kuroda, K.; Katata, T. et al. (2002): Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. In: *Journal of Cell Biology* 156 (3), S. 555–565.
- Mizuno, M.; Matsumoto, A.; Hamada, N.; Ito, H.; Miyauchi, A.; Jimbo, E. F. et al. (2015): Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders. In: *Journal of Neurochemistry* 132 (1), S. 61–69.
- Montani, D.; Chaumais, M.-C.; Guignabert, C.; Günther, S.; Girerd, B.; Jaïs, X. et al. (2014): Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. In: *Pharmacology & Therapeutics* 141 (2), S. 172–191.
- Montfort, W. R.; Wales, J. A.; Weichsel, A. (2017): Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 26 (3), S. 107–121.
- MSD Sharp & Dohme GmbH (2016): Fachinformation Adempas® 1,5 mg Filmtabletten. Zulassungsnummer EU/1/13/907/007, Stand Juni 2016. Hg. v. Rote Liste Service GmbH. Online verfügbar unter <http://www.fachinfo.de/pdf/020100>, zuletzt geprüft am 04.02.2017.
- Mülsch, A.; Bauersachs, J.; Schäfer, A.; Stasch, J.-P.; Kast, R.; Busse, R. (1997): Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. In: *British Journal of Pharmacology* 120 (4), S. 681–689.
- Murrell, W. (1879): Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. In: *Lancet* 1, S. 80–81.
- Nakane, M.; Arai, K.; Saheki, S.; Kuno, T.; Buechler, W.; Murad, F. (1990): Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (28), S. 16841–16845.

- Nakane, M.; Saheki, S.; Kuno, T.; Ishii, K.; Murad, F. (1988): Molecular cloning of a cDNA coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157 (3), S. 1139–1147.
- Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. In: *Plant Cell* 2 (4), S. 279–289.
- Nguyen, H.; Amanullah, A. M. (2014): Therapeutic potentials of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular disease. In: *Reviews in Cardiovascular Medicine* 15 (2), S. 158–167.
- Nikonenko, I.; Nikonenko, A.; Mendez, P.; Michurina, T. V.; Enikolopov, G.; Muller, D. (2013): Nitric oxide mediates local activity-dependent excitatory synapse development. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (44), S. 4142–4151.
- O'Dell, T. J.; Hawkins, R. D.; Kandel, E. R.; Arancio, O. (1991): Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (24), S. 11285–11289.
- Omori, K.; Kotera, J. (2007): Overview of PDEs and their regulation. In: *Circulation Research* 100 (3), S. 309–327.
- Padayatti, P. S.; Pattanaik, P.; Ma, X.; van den Akker, F. (2004): Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases. In: *Pharmacology and Therapeutics* 104 (2), S. 83–99.
- Palmer, R.M.J.; Ashton, D. S.; Moncada, S. (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. In: *Nature* 333 (6174), S. 664–666.
- Palmer, R.M.J.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. In: *Nature* 327 (6122), S. 524–526.
- Pan, L.; Chen, J.; Yu, J.; Yu, H.; Zhang, M. (2011): The structure of the PDZ3-SH3-GuK tandem of ZO-1 protein suggests a supramodular organization of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family scaffold protein core. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (46), S. 40069–40074.
- Pangon, L.; van Kralingen, C.; Abas, M.; Daly, R. J.; Musgrove, E. A.; Kohonen-Corish, M. R. J. (2012): The PDZ-binding motif of MCC is phosphorylated at position -1 and controls



- lamellipodia formation in colon epithelial cells. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 (6), S. 1058–1067.
- Pedersen, S. W.; Albertsen, L.; Moran, G. E.; Levesque, B.; Pedersen, S. B.; Bartels, L. et al. (2017): Site-Specific Phosphorylation of PSD-95 PDZ Domains Reveals Fine-Tuned Regulation of Protein-Protein Interactions. In: *ACS Chemical Biology* 12(9), S. 2313–2323.
- Perego, C.; Vanoni, C.; Massari, S.; Longhi, R.; Pietrini, G. (2000): Mammalian LIN-7 PDZ proteins associate with  $\beta$ -catenin at the cell-cell junctions of epithelia and neurons. *EMBO Journal* 19 (15), S. 3978–3989.
- Petit, M. M. R.; Meulemans, S. M. P.; Alen, P.; Ayoubi, T. A. Y.; Jansen, E.; Van de Ven, W. J. M. (2005): The tumor suppressor Scrib interacts with the zyxin-related protein LPP, which shuttles between cell adhesion sites and the nucleus. In: *BMC Cell Biology* 6.
- Piontek, J.; Winkler, L.; Wolburg, H.; Müller, S. L.; Zuleger, N.; Piehl, C. et al. (2008): Formation of tight junction: Determinants of homophilic interaction between classic claudins. In: *FASEB Journal* 22 (1), S. 146–158.
- Raeymaekers, L.; Eggermont, J. A.; Wuytack, F.; Casteels, R. (1990): Effects of cyclic nucleotide dependent protein kinases on the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump of bovine pulmonary artery. In: *Cell Calcium* 11 (4), S. 261–268.
- Reissner, C.; Missler, M. (2014): MAGUKs end a tale of promiscuity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (49), S. 17350–17351.
- Resh, M. D. (1998): Fyn, a Src family tyrosine kinase. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30 (11), S. 1159–1162.
- Rikitake, Y.; Mandai, K.; Takai, Y. (2012): The role of nectins in different types of cell-cell adhesion. In: *Journal of Cell Science* 125 (16), S. 3713–3722.
- Rolland, T.; Taşan, M.; Charlotiaux, B.; Pevzner, S. J.; Zhong, Q.; Sahni, N. et al. (2014): A proteome-scale map of the human interactome network. In: *Cell* 159 (5), S. 1212–1226.
- Rothkegel, C.; Schmidt, . M.; Atkins, D.-J.; Hoffmann, L. S.; Schmidt, H. H. H. W.; Schröder, H.; Stasch, J.-P. (2007): Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation in vivo. In: *Molecular Pharmacology* 72 (5), S. 1181–1190.

- Russwurm, M.; Behrends, S.; Harteneck, C.; Koesling, D. (1998): Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. In: *Biochemical Journal* 335 (1), S. 125–130.
- Russwurm, M.; Russwurm, C.; Koesling, D.; Mergia, E. (2013): NO/cGMP: The past, the present, and the future. In: *Methods in Molecular Biology* 1020 S.1-16.
- Russwurm, M.; Wittau, N.; Koesling, D. (2001): Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive  $\alpha 2\beta 1$  guanylyl cyclase to synaptic membranes. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (48), S. 44647–44652.
- Schirrmann, T.; Büsow K. (2010): Transient Production of scFv-Fc Fusion Proteins in Mammalian Cells. In: Kontermann R, Dübel S (Hg.): *Antibody Engineering*. Berlin Heidelberg: Springer, S. 387–398.
- Schmidt, A.; Utepbergenov, D. I.; Mueller, S. L.; Beyermann, M.; Schneider-Mergener, J.; Krause, G.; Blasig, I. E. (2004a): Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (11), S. 1354–1365.
- Schmidt, P. M.; Schramm, M.; Schröder, H.; Wunder, F.; Stasch, J.-P. (2004b): Identification of Residues Crucially Involved in the Binding of the Heme Moiety of Soluble Guanylate Cyclase. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (4), S. 3025–3032.
- Schoser, B.G.H.; Behrends, S. (2001): Soluble guanylyl cyclase is localized at the neuromuscular junction in human skeletal muscle. In: *NeuroReport* 12 (5), S. 979–981.
- Schuman, E. M.; Madison, D. V. (1991): A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. In: *Science* 254 (5037), S. 1503–1506.
- Schwabe, U.; Paffrath, D. (2016): *Arzneiverordnungs-Report 2016*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Shaul, P. W.; Smart, E. J.; Robinson, L. J.; German, Z.; Yuhanna, I. S.; Ying, Y. et al. (1996): Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (11), S. 6518–6522.
- Shaw, G.; Morse, S.; Ararat, M.; Graham, F. L. (2002): Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. In: *FASEB Journal* 16 (8), S. 869–871.

- Shelly, M.; Mosesson, Y.; Citri, A.; Lavi, S.; Zwang, Y.; Melamed-Book, N. et al. (2003): Polar expression of ErbB-2/HER2 in epithelia. Bimodal regulation by Lin-7. In: *Developmental Cell* 5 (3), S. 475–486.
- Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. In: *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59, S. 223–239.
- Shimomura, O. (2009): Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (31), S. 5590–5602.
- Shin, H.; Hsueh, Y. P.; Yang, F. C.; Kim, E.; Sheng, M. (2000): An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. In: *The Journal of Neuroscience* 20 (10), S. 3580–3587.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W. et al. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In: *Molecular Systems Biology* 7 (1), S. 539.
- Simske, J. S.; Kaech, S. M.; Harp, S. A.; Kim, S. K. (1996): LET-23 receptor localization by the cell junction protein LIN-7 during *C. elegans* vulval induction. *Cell*. In: *Cell* 85 (2), S. 195–204.
- Snyder, S. H.; Jaffrey, S. R.; Zakhary, R. (1998): Nitric oxide and carbon monoxide: Parallel roles as neural messengers. In: *Brain Research Reviews* 26 (2-3), S. 167–175.
- Soltau, M.; Berhorster, K.; Kindler, S.; Buck, F.; Richter, D.; Kreienkamp, H.-J. (2004): Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. In: *Journal of Neurochemistry* 90 (3), S. 659–665.
- Son, H.; Hawkins, R. D.; Martin, K.; Kiebler, M.; Huang, P. L.; Fishman, M. C.; Kandel, E. R. (1996): Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. In: *Cell* 87 (6), S. 1015–1023.
- Stasch, J.-P.; Schmidt, P.; Alonso-Alija, C.; Apeler, H.; Dembowski, K.; Haerter, M. et al. (2002): No- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: Molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. In: *British Journal of Pharmacology* 136 (5), S. 773–783.

- Steinert, J. R.; Kopp-Scheinflug, C.; Baker, C.; Challiss, R.A.J.; Mistry, R.; Haustein, M. D. et al. (2008): Nitric Oxide Is a Volume Transmitter Regulating Postsynaptic Excitability at a Glutamatergic Synapse. In: *Neuron* 60 (4), S. 642–656.
- Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. (2015): HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. In: *Gene* 569 (2), S. 182–190.
- Stiffler, M. A.; Chen, J. R.; Grantcharova, V. P.; Lei, Y.; Fuchs, D.; Allen, J. E. et al. (2007): PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. In: *Science* 317 (5836), S. 365–369.
- Straight, S. W.; Pieczynski, J. N.; Whiteman, E. L.; Liu, C.-J.; Margolis, B. (2006): Mammalian Lin-7 stabilizes polarity protein complexes. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (49), S. 37738–37747.
- Straub, A.; Stasch, J. P.; Alonso-Alija, C.; Benet-Buchholz, J.; Ducke, B.; Feurer, A.; Fürstner, C. (2001): NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11 (6), S. 781–784.
- Sunahara, R. K.; Beuve, A.; Tesmer, J.J.G.; Sprang, S. R.; Garbers, D. L.; Gilman, A. G. (1998): Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (26), S. 16332–16338.
- Surks, H. K.; Mochizuki, N.; Kasai, Y.; Georgescu, S. P.; Tang, K. M.; Ito, M. et al. (1999): Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I $\alpha$ . In: *Science* 286 (5444), S. 1583–1587.
- Sutherland, Earl W.; Rall, T. W. (1958): Fraction and Characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. In: *Journal of Biological Chemistry* 232 (2), S. 1077–1092.
- Szabadits, E.; Cserép, C.; Ludányi, A.; Katona, I.; Gracia-Llanes, J.; Freund, T. F.; Nyíri, G. (2007): Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. In: *Journal of Neuroscience* 27 (30), S. 8101–8111.
- Takai, Y.; Irie, K.; Shimizu, K.; Sakisaka, T.; Ikeda, W. (2003): Nectins and nectin-like molecules: Roles in cell adhesion, migration, and polarization. In: *Cancer Science*. 94 (8), S. 655–667.

- Taqatqeh, F.; Mergia, E.; Neitz, A.; Eysel, U. T.; Koesling, D.; Mittmann, T. (2009): More than a retrograde messenger: Nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. In: *Journal of Neuroscience* 29, S. 9344–9350.
- Tavares, G. A.; Panepucci, E. H.; Brunger, A. T. (2001): Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. In: *Molecular Cell* 8 (6), S. 1313–1325.
- Vasioukhin, V.; Fuchs, E. (2001): Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. In: *Current Opinion in Cell Biology* 13 (1), S. 76–84.
- Wedel, B.; Humbert, P.; Harteneck, C.; Foerster, J.; Malkewitz, J.; Böhme, E. et al. (1994): Mutation of His-105 in the  $\beta 1$  subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (7), S. 2592–2596.
- White, R. R.; Kwon, Y.-G.; Taing, M.; Lawrence, D. S.; Edelman, A. M. (1998): Definition of optimal substrate recognition motifs of  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinases IV and II reveals shared and distinctive features. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (6), S. 3166–3172.
- Williams, J. H.; Li, Y.-G.; Nayak, A.; Errington, M. L.; Murphy, K.P.S.J.; Bliss, T.V.P. (1993): The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent. In: *Neuron* 11 (5), S. 877–884.
- Winger, J. A.; Marletta, M. A. (2005): Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: Interaction with the heme domain. In: *Biochemistry* 44 (10), S. 4083–4090.
- Wu, C.-C.; Ko, F.-N.; Kuo, S.-C.; Lee, F.-Y.; Teng, C.-M. (1995): YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. In: *British Journal of Pharmacology* 116 (3), S. 1973–1978.
- Wu, H.; Reissner, C.; Kuhlendahl, S.; Coblenz, B.; Reuver, S.; Kindler, S. et al. (2000): Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. In: *The EMBO Journal* 19 (21), S. 5740–5751.
- Wu, Hai-Yan; Hsu, Fu-Chun; Gleichman, Amy J.; Baconguis, Isabelle; Coulter, Douglas A.; Lynch, David R. (2007): Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (28), S. 20075–20087.

- Yamamoto, Y.; Mandai, K.; Okabe, N.; Hoshino, T.; Nakanishi, H.; Takai, Y. (2002): Localization of mLin-7 at nectin based cell-cell junctions. In: *Oncogene* 21 (16), S. 2545–2554.
- Ye, F.; Zhang, M. (2013): Structures and target recognition modes of PDZ domains: Recurring themes and emerging pictures. In: *Biochemical Journal* 455 (1), S. 1–14.
- Zabel, U.; Häusler, C.; Weeger, M.; Schmidt, H.H.H.W. (1999): Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione S-transferase affinity tag. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (26), S. 18149–18152.
- Zabel, U.; Kleinschnitz, C.; Oh, P.; Nedvetsky, P.; Smolenski, A.; Müller, H. et al. (2002): Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. In: *Nature Cell Biology* 4 (4), S. 307–311.
- Zhang, Y.; Yeh, S.; Appleton, B. A.; Held, H. A.; Kausalya, P. J.; Phua, D.C.Y. et al. (2006): Convergent and divergent ligand specificity among PDZ domains of the LAP and zonula occludens (ZO) families. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (31), S. 22299–22311.
- Zhu, J.; Shang, Y.; Xia, C.; Wang, W.; Wen, W.; Zhang, M. (2011): Guanylate kinase domains of the MAGUK family scaffold proteins as specific phospho-protein-binding modules. In: *The EMBO Journal* 30 (24), S. 4986–4997.
- Zucker, R. S. (1989): Short-term synaptic plasticity. In: *Annual Review of Neuroscience* 12, S. 13–31.

## 10 Abkürzungsverzeichnis

8-Br-cGMP	8-Bromoguanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
AD	alzheimer's disease
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
CAM	adhesion molecule
CamKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
Crb	Crumbs
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CGN	cyclic nucleotide-gated ion channels
CLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop /Mikroskopie
CREB	cAMP responsive element binding protein
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DIC	differential interference contrast
DLG 1	Disc large 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein
eNOS	endotheliale Stickstoffmonooxidsynthase
EU	Europäische Union
FBS	fetales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GK	Guanylat-Kinase
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HCN-Kanäle	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel
HEK293-Zellen	human embryonic kidney -Zellen
H-NOX	heme nitric oxide binding
HRP	horseradish peroxidase
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP	Immunopräzipitation
L27	Proteindomäne Lin2-Lin7
LB	lysogeny broth
LTP	Langzeitpotenzierung

MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase
MALS	mamalian LIN-seven protein
MCC	mutated in colorectal cancer
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MPP	Membrane Palmitoylated Protein
mRNA	messenger RNA
MSD	Merck Sharp & Dohme
MUPP	multiple PDZ-Domänen Protein
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOsGC	NO sensitive Guanylat-Cyclase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOsGC	NO-sensitive Guanylylcyclase
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALS	protein associated with Lin7
PAS	Proteindomäne Per-Arnt-Sim
PATJ	Pals-1 assoziiertes Protein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	Proteindomäne PSD-95, disc large und zonula occulenses
PEI	Polyethylenimin
PKG	Proteinkinase G
PPR	paired-pulse Facilitation
PSD	postsynaptische Dichte
PSG-Modul	Supramodul aus PDZ-SH3- und GK-Domäne eines MAGUKs
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
SAP	synapse associated protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error over mean
SH3	Src-homology 3
siRNA	small interfering RNA
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glucose
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
Veli	vertebrate homologs of Lin7
WT	Wildtyp
YC-1	3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazol
YFP	gelb fluoreszierendes Protein



## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Sönke Behrends, der mir den Arbeitsplatz am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der TU Braunschweig und das Promotionsthema zur Verfügung gestellt hat. Ich danke ihm herzlich für die umfassende Betreuung und Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Ingo Rustenbeck für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Frau Professorin Dr. Ute Wittstock für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Für die technische Unterstützung bedanke ich mich bei Ines Thomsen, Ines Glöckner und Gerlind Henze-Wittenberg. Dabei wird mir besonders die anhaltende Hilfsbereitschaft und Motivation von Ines Thomsen in guter Erinnerung bleiben.

Den ehemaligen und aktuellen Kollegen am Institut danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für eine schöne gemeinsame Zeit. Ich werde immer gerne an unsere fachlichen Diskussionen, aber auch an diverse Freizeitaktivitäten zurückdenken. Im Besonderen möchte ich mich bei Mareike Thon bedanken, die mich gewissenhaft und geduldig eingearbeitet hat.

Ich möchte mich auch bei dem Team vom Arzneipflanzengarten für die Bereitstellung eines hervorragenden Frischluft-Refugiums bedanken, in dem wir unsere Mittagspausen und so manche laue Sommerabende gerne verbracht haben.

Allen Korrekturlesern danke ich herzlich für ihre fachlichen Anregungen, die zurechtgerückten Kommata und ihre Geduld.

Ein besonders großer Dank geht an meine Eltern und meine Schwester, die mich über die gesamte Zeit uneingeschränkt unterstützt und wenn nötig auch aufgebaut haben.